

UNIVERSITÉ RENÉ DESCARTES DE PARIS

UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE DES MÉCANISMES D'ACTION
DES MÉDICAMENTS ET DES TOXIQUES

Année 1970 - 1971

Série E - N° 220

THÈSE

présentée

A L'UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE
DES MÉCANISMES D'ACTION DES MÉDICAMENTS ET DES TOXIQUES
DE L'UNIVERSITÉ RENÉ DESCARTES DE PARIS

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR EN PHARMACIE

(Diplôme d'état)

par

Jean-Michel WARNET

Pharmacien-Lauréat de la Faculté de Paris

Ex-Interne des Hôpitaux de Paris

Titre de la Thèse :

**RECHERCHES DE TOXICOLOGIE BIOCHIMIQUE SUR LA STÉATOSE HÉPATIQUE
PROVOQUÉE PAR LE PHOSPHORE BLANC**

Soutenue le 9 Février 1971

JURY : MM. R. TRUHAUT, Président

P. MALANGEAU, Examinateur

J. R. CLAUDE »

UNIVERSITE REGE THOMAS DE PARIS

UNITE REGE THOMAS DE PARIS
UNITE REGE THOMAS DE PARIS

UNITE REGE THOMAS DE PARIS

THESE

UNITE REGE THOMAS DE PARIS

UNITE REGE THOMAS DE PARIS
UNITE REGE THOMAS DE PARIS
UNITE REGE THOMAS DE PARIS

UNITE REGE THOMAS DE PARIS
UNITE REGE THOMAS DE PARIS

UNITE REGE THOMAS DE PARIS
UNITE REGE THOMAS DE PARIS
UNITE REGE THOMAS DE PARIS

UNITE REGE THOMAS DE PARIS

UNITE REGE THOMAS DE PARIS
UNITE REGE THOMAS DE PARIS
UNITE REGE THOMAS DE PARIS

UNITE REGE THOMAS DE PARIS
UNITE REGE THOMAS DE PARIS
UNITE REGE THOMAS DE PARIS

UNIVERSITÉ RENÉ DESCARTES DE PARIS

UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE DES MÉCANISMES D'ACTION
DES MÉDICAMENTS ET DES TOXIQUES

Année 1970 - 1971

Série E - N° 220

THÈSE

présentée

A L'UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE
DES MÉCANISMES D'ACTION DES MÉDICAMENTS ET DES TOXIQUES
DE L'UNIVERSITÉ RENÉ DESCARTES DE PARIS

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR EN PHARMACIE

(Diplôme d'état)

par

Jean-Michel WARNET

Pharmacien-Lauréat de la Faculté de Paris

Ex-Interne des Hôpitaux de Paris

Titre de la Thèse :

**RECHERCHES DE TOXICOLOGIE BIOCHIMIQUE SUR LA STÉATOSE HÉPATIQUE
PROVOQUÉE PAR LE PHOSPHORE BLANC**

Soutenue le 9 février 1971

JURY : MM. R. TRUHAUT, Président

P. MALANGEAU, Examinateur

J. R. CLAUDE

»



A ma Femme,

A ma Fille,

A ma Famille,

A mes Amis.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41550410_0017

A Monsieur le Professeur René TRUHAUT,

Membre de l'Académie des Sciences,

Membre de l'Académie Nationale de Médecine,

Professeur de Toxicologie et d'Hygiène industrielle à la
Faculté de Pharmacie de Paris,

Pharmacien-Chef des Hôpitaux Psychiatriques de la Seine,
Chef de l'Unité de Chimiothérapie de l'Institut Gustave
ROUSSY,

Commandeur de la Légion d'Honneur,

à qui nous exprimons notre extrême gratitude pour l'intérêt
scientifique, les conseils, l'appui moral qu'il n'a cessé
de nous manifester et de nous prodiguer depuis que nous
avons eu l'honneur d'être accepté parmi ses élèves.

Ses connaissances exceptionnelles dans les domaines de la
Toxicologie et de la Biochimie, son aptitude à dominer tous
les problèmes de la recherche nous ont apporté une aide
inestimable dans la conception et la réalisation de nos
travaux. Sa personnalité, l'énergie et le dynamisme qu'il
communique à ceux qui l'approchent, nous ont soutenu dans
les moments les plus difficiles.

Qu'il veuille bien accepter l'assurance de notre dévouement
et de notre reconnaissance.

A Monsieur le Professeur Pierre MALANGEAU,

Doyen honoraire de la Faculté de Pharmacie de Paris,

Professeur de chimie Analytique à la Faculté de Pharmacie
de Paris,

Pharmacien-chef des Hôpitaux Psychiatriques de la Seine,

Chevalier de la Légion d'Honneur,

Au service duquel nous avons l'honneur d'appartenir en tant
qu'assistant.

Ses compétences dans le domaine de la biochimie et dans
l'analyse biologique nous faisaient vivement souhaiter sa
présence dans notre jury pour juger notre travail.

Nous tenons à lui présenter nos sentiments de respectueux
dévouement.

A Monsieur Jean-Roger CLAUDE,

Maître de conférences agrégé de la Faculté de Pharmacie
de Reims,

Directeur de laboratoire à la Direction Générale de
l'Action Sanitaire et Sociale de la Préfecture de Paris,

qui nous a guidé et suivi constamment dans l'élaboration
de ce travail avec une grande compétence, une sollicitude
et un enthousiasme de chaque instant.

Nous lui sommes particulièrement reconnaissant d'avoir
contribué dans une très large mesure à nous orienter vers
cette discipline de tout premier plan, la Toxicologie,
notamment dans ses rapports avec la Biochimie.

Au sein du groupe qu'il a su constituer, il nous a toujours
manifesté son soutien, ses encouragements et sa confiance
face aux nombreuses responsabilités qu'il a bien voulu nous
faire partager.

Qu'il veuille bien trouver ici le témoignage de notre très
sincère estime, de notre profond attachement et de notre
très amical dévouement.

A Monsieur le Préfet ORSETTI,

Directeur Général de l'Action Sanitaire et Sociale à la
Préfecture de Paris,

Au service duquel nous avons l'honneur d'appartenir, dans
le cadre des laboratoires de la D.G.A.S.S.

Qu'il veuille bien accepter l'expression de nos sentiments
très respectueux et très dévoués.

A Monsieur le Docteur G. BONNAUD,

Médecin-Inspecteur,

Chef du Service de Dépistage Systématique de la Tuberculose,
des Affections Cardio-Vasculaires et des Centres d'Examens
Complémentaires,

qui a bien voulu nous accueillir au laboratoire de la Direction
Générale de l'Action Sanitaire et Sociale de la Préfecture de
Paris.

L'intérêt qu'il manifeste à la recherche scientifique, la place
qu'il consent à lui accorder, en la considérant comme le cataly-
seur du développement de ses services, nous ont permis dans une
large mesure de réaliser nos travaux.

Nous tenons à lui adresser nos remerciements et l'assurance de
notre dévouement.

Nous tenons à adresser nos plus vifs remerciements à toutes les personnalités qui nous ont apporté aide et conseils pour certaines parties de ce travail :

A Monsieur le Professeur C. BOUDENE,
qui nous a obligeamment documenté sur la toxicologie du Phosphore blanc.

A Monsieur R. PODEVIN,
Docteur en Pharmacie, Chargé de Recherches à l'INSERM, dont les connaissances et l'appui technique dans le domaine de l'investigation isotopique nous ont été très précieux.

Au Docteur Ph. LAUDAT,
Directeur du Groupe de Recherches sur le métabolisme des lipides de l'INSERM, qui nous a fait bénéficier de ses connaissances dans le domaine de l'exploration dynamique du métabolisme lipidique.

Au Docteur MOLAS,

qui a bien voulu se charger de nos examens anatomo-
pathologiques.

A Madame T. PRINGUET,

qui a accepté avec efficacité d'assurer l'indispensable
liaison avec le Centre de Recherches Toxicologiques de la
Faculté de Pharmacie de Paris.

Nous exprimons enfin notre particulière gratitude à nos collègues des
laboratoires de la Direction Générale de l'Action Sanitaire et Sociale
de la Préfecture de Paris :

Madame F. CORRE, Monsieur M. THEVENIN,

et à tous les techniciens qui nous ont apporté leur précieux concours,
en particulier :

Madame C. LEVALLOIS, Madame A. NAUGUET et Madame M. BENOIST.

TABLE DES MATIERES

	<u>Pages</u>
<u>INTRODUCTION</u>	1
<u>PREMIERE PARTIE.- LE PHOSPHORE BLANC</u>	4
- <u>Chapitre Premier.-</u> Rappel physico-chimique	5
- <u>Chapitre Second .-</u> Toxicologie du phosphore blanc	8
I- Etiologie des intoxications	8
A- Historique - Fréquence des intoxications	8
B- Intoxications aiguës	9
C- Intoxications à long terme	13
II- Symptomatologie des intoxications aiguës	14
A- Intoxications humaines	14
B- Observations expérimentales	21
 <u>DEUXIEME PARTIE.-</u> DONNEES GENERALES SUR LE METABOLISME LIPIDIQUE - ROLE DU FOIE - LES MECANISMES DE LA STEATOSE	 32
- <u>Chapitre Premier.-</u> Rappel métabolique	33
I- Digestion et absorption	33
II- Biogénèse des lipides endogènes	36
A- Constituants élémentaires	37
B- Biogénèse des triglycérides et des glycérophospholipides	46
III- Catabolisme des lipides	48
A- Triglycérides	48
B- Phospholipides	50
C- Acides gras	51
- <u>Chapitre Deuxième.-</u> Rôle du foie dans le métabolisme lipidique	54
- <u>Chapitre Troisième.-</u> Conséquences : les mécanismes possibles de la stéatose hépatique	58

1- Augmentation de la synthèse hépatique des triglycérides	58
2- Diminution de la dégradation hépatique des triglycérides	58
3- Augmentation de la mobilisation des acides gras	58
4- Diminution de l'utilisation des triglycérides hépatiques	59

<u>TROISIEME PARTIE.-</u> MATERIEL ET METHODES	61
- <u>Chapitre Premier.-</u> Matériel Biologique	62
I- Matériel animal	62
II- Forme d'administration du phosphore blanc	62
III- Préparation de la pulpe hépatique	63
- <u>Chapitre Second .-</u> Techniques utilisées	64
I- Détermination des activités enzymatiques hépatiques	64
II- Dosage des composés azotés hépatiques	68
1- Dosage des protéines	68
2- Dosage de l'azote total	69
III- Méthodes d'étude des lipides	69
A- Analyse quantitative des principaux constituants lipidiques	69
1- Dosage des lipides totaux	69
2- Dosage des triglycérides	71
3- Dosage du cholestérol total	73
4- Dosage des phospholipides	73
5- Dosage des acides gras non estérifiés plasmatiques ..	74
6- Dosage du glycérol sérique	75
B- Analyse chromatographique des diverses fractions lipidiques	77
1- Fractionnement des principales classes de lipides ...	78
2- Séparation des diverses fractions phospholipidiques .	79

IV- Techniques d'étude des β -lipoprotéines	80
V- Méthodes d'étude radioisotopique	84
A- Préparation de la solution d'acide palmitique tritié ...	84
B- Conditions expérimentales de l'étude de l'incorporation de l'acide palmitique ^3H -9-10	86
C- Préparation des échantillons	87
1- β -lipoprotéines sériques	87
2- Lipides hépatiques	88
D- Mesure de la radioactivité	89
VI- Méthodes d'analyse statistique	93

QUATRIEME PARTIE.- ETUDE DU DEVELOPPEMENT DE LA STEATOSE EN FONCTION
DES CONDITIONS D'INTOXICATION

- <u>Chapitre Premier.-</u> Essais de tolérance générale	96
A- Protocole	96
B- Résultats	97
C- Discussion	100
- <u>Chapitre Deuxième.-</u> Injection de doses répétées et variables ..	104
I- Protocole	104
II- Résultats	106
A- Action sur l'évolution du poids corporel	106
B- Action sur le poids des foies	106
C- Action biochimique sur le tissu hépatique	107
D- Action biochimique sur les lipides sériques	108
III- Discussion	112
- <u>Chapitre Troisième.-</u> Injection d'une dose unique: étude cinéti- que du développement de la stéatose	116
I- Expériences préliminaires	116
A- Protocole	116
B- Résultats	117

C- Discussion	120
II- Etude cinétique du développement de la stéatose phosphorée	121
A- Protocole	121
B- Résultats	123
1- Tolérance générale en fonction de la durée d'exposition	123
2- Action sur le poids du foie	124
3- Action sur les lipides hépatiques	124
4- Action sur les enzymes hépatiques	130
5- Action sur les lipides sériques	134
C- Discussion	139
III- Etude de la reproductibilité de l'action stéatogène du phosphore blanc	144
A- Protocole	144
B- Résultats	144
C- Discussion	147
IV- Etude de l'augmentation pondérale du foie	148
A- Protocole	148
B- Résultats	149
C- Discussion	151

CINQUIEME PARTIE.- MISE EN EVIDENCE DU MECANISME DE LA STEATOSE PHOSPHOREE 155

- <u>Chapitre Premier.-</u> Etude cinétique de la mobilisation des lipides périphériques	158
A- Protocole	159
B- Résultats	159
C- Discussion	165
- <u>Chapitre Deuxième.-</u> Etude de l'incorporation de l'acide palmitique tritié	167
I- Mise au point d'un protocole expérimental et des techniques d'analyse	168

A- Problèmes d'ordre biologique	168
B- Problèmes d'ordre technique	171
C- Etude de la durée d'incorporation de l'acide palmitique tritié	173
II- Expérimentation définitive	177
A- Protocole	177
B- Résultats	178
1- Action sur les lipides hépatiques et les triglycérides sériques	178
2- Action sur l'incorporation du palmitate tritié dans les lipides hépatiques	180
3- Action sur l'incorporation du palmitate tritié dans les β -lipoprotéines sériques	182
C- Discussion	184
- <u>Annexe</u> .- Anatomopathologie	196
<u>CONCLUSIONS GENERALES</u> .-	198

*

*

*

ABREVIATIONS	UTILISEES
--------------	-----------

ACTH	Hormone adrénocorticotrope
ADP	Adénosine diphosphate
A.G.N.E.	Acides gras non estérifiés
AMP	Adénosine monophosphate
AMP cyclique	Adénosine 3' 5' monophosphate cyclique
ATP	Adénosine triphosphate
CDP	Cytidine diphosphate
CMP	Cytidine monophosphate
CoA (CoA-SH)	Coenzyme A
C.T.	Cholestérol total
CTP	Cytidine triphosphate
DG	Diglycérides
DHAP	Dihydroxyacétonephosphate
DNA	Acide désoxyribonucléique
FMN	Flavine mononucléotide
GAP	Glycéraldéhydephosphate
GK	Glycérokinase
GOT	Transaminase glutamique oxaloacétique
GPT	Transaminase glutamique-pyruvique
G6PD	Glucose-6-phosphate déshydrogénase
LDH	Lactico-déshydrogénase
LP	Lipoprotéines
L.T.	Lipides totaux
MDH	Malico-déshydrogénase
MG	Monoglycérides
NAD	Nicotinamide adénine dinucléotide oxydé
NADH (NADH, H ⁺)	Nicotinamide adénine dinucléotide réduit
NADP	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydé

NADPH (NADPH, H^+)	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit
P	Phosphate
PEP	Phosphoenolpyruvate
PK	Phosphokinase (page 47) Pyruvatekinase (page 75)
PL	Phospholipides
PP	Pyrophosphate
RNA _m	Acide ribonucléique messenger
RNA _t	Acide ribonucléique de transfert
STH	Hormone somatotrope
TG	Triglycérides
TSH	Hormone thyroïdienne

I N T R O D U C T I O N

Parmi les divers processus pathologiques dont le foie peut être le siège, il en est un qui est particulièrement remarquable : la stéatose, que l'on définit comme étant l'accumulation des lipides dans les cellules parenchymateuses hépatiques.

Ce phénomène est d'une importance considérable en Toxicologie, car il peut être provoqué par de nombreuses substances de nature chimique très variée que l'on peut classer en deux grands groupes :

- d'une part, les toxiques minéraux dont les principaux sont l'arsenic et le phosphore blanc,
- d'autre part, les toxiques organiques qui comprennent des composés aussi différents que les "solvants chlorés" (trichloréthylène et surtout tétrachlorure de carbone), un alcool tel que l'éthanol, un corps à action antipyrétique, le cinchophène, et des peptides végétaux tels que les Amanitatoxines.

Si la description de ce phénomène est désormais classique, il n'en est pas de même de son mécanisme de production qui, malgré de très nombreuses études, n'est pas encore totalement éclairci. Cela est vrai notamment dans le cas du phosphore blanc, qui est le type même du toxique stéatosant, très anciennement connu d'ailleurs, puisque la première observation, en France, remonte à 1855 (MARCHAND cité par FRITZ & coll. 163).

Nous l'avons donc choisi comme toxique type pour ces travaux dont l'objectif est double :

- Tout d'abord, l'étude du mécanisme responsable de l'action d'un composé toxique sur un organe déterminé, qui présente un intérêt théorique évident.

C'est en effet une des orientations de la toxicologie moderne de rechercher la ou les causes profondes des phénomènes observés et, pour atteindre ce but, le toxicologue est amené à diversifier de façon permanente les méthodologies qu'il utilise en empruntant, notamment à la biochimie, nombre de ses procédés expérimentaux, réalisant ainsi une véritable Toxicologie biochimique.

Pour étudier le ou les mécanismes de la stéatose hépatique provoquée par le phosphore blanc, nous avons été amené à explorer certaines voies des métabolismes glucidique, lipidique et protéique.

- Le deuxième objectif est de contribuer à la définition d'une méthode d'étude d'un toxique hépatique stéatogène, ce qui présente l'intérêt de fournir au toxicologue (et éventuellement au pharmacologue) "un système" lui permettant d'étudier l'activité de diverses substances pour le traitement ou la prévention de la stéatose.

Nous n'aurions pû concevoir et entreprendre une expérimentation dans un domaine aussi complexe sans les connaissances profondes et les conseils du Professeur R. TRUHAUT, véritable pionnier de la Toxicologie biochimique et nous tenons à lui exprimer notre gratitude et notre admiration.

Au sein de la véritable école que le Professeur TRUHAUT a créée dans cette discipline, son collaborateur, le Professeur Agrégé J.R. CLAUDE a

formé un groupe de chercheurs spécialisés sur les problèmes en rapport avec le métabolisme lipidique. Nous lui adressons également nos remerciements pour l'appui permanent qu'il nous a apporté.

L'exposé de nos travaux comprendra cinq parties :

Une première partie, nécessaire à la compréhension des problèmes, est une mise au point synthétique des connaissances relatives à la physico-chimie du Phosphore Banc ainsi qu'à ses propriétés biologiques et notamment à ses potentialités toxiques.

Dans une deuxième partie, nous présenterons les principales données actuelles sur le métabolisme lipidique, en y envisageant en priorité le rôle du foie et les mécanismes biochimiques susceptibles d'induire la stéatose hépatique..

Une troisième partie sera consacrée à la description du matériel et des techniques que nous avons utilisées.

Dans une quatrième partie, nous étudierons le développement de la stéatose phosphorée en fonction des conditions d'intoxication.

Pour terminer, nous aborderons l'étude des mécanismes conditionnant l'apparition de cette stéatose toxique.

Nous tenterons ensuite de tirer les conclusions qui découlent des résultats obtenus.

PREMIERE PARTIE

LE PHOSPHORE BLANC

- Chapitre Premier : Rappel physico-chimique.
- Chapitre Second : Toxicologie du phosphore blanc.

CHAPITRE PREMIER

RAPPEL PHYSICO-CHIMIQUE

Le phosphore, découvert en 1669 par l'alchimiste allemand de Hambourg BRANDT, est un métalloïde faisant partie du groupe Vb de la classification périodique des éléments dans lequel on trouve, curieusement, deux autres éléments ayant également une action stéatogène : l'arsenic et l'antimoine.

Le phosphore se présente sous l'aspect d'un solide blanc ambré, translucide quand il a été fondu récemment, mais devenant rapidement laiteux et opaque ; il est légèrement mou à + 25°C et possède une faible odeur alliagée. Sa densité à 20°C est de 1,82 ; il fond à 44,1°C mais la surfusion est très marquée. Assez facilement volatil, le phosphore blanc est entraîné à la distillation par un courant de vapeur d'eau ce qui permet de le séparer dans un mélange complexe. Il bout à 280°C. A l'état solide et liquide, le phosphore blanc contient les mêmes molécules tétraédriques, P₄, que la vapeur.

Le phosphore blanc est pratiquement insoluble dans l'eau froide, légèrement soluble dans l'eau chaude et dans l'alcool (0,3 g dans 100 ml) plus soluble dans l'éther éthylique (1 %) le chloroforme (2,5 %), le benzène (2,86 %), le toluène, l'éther de pétrole et l'essence de térébenthine, très soluble dans le sulfure de carbone (125 %). Il est en outre soluble dans les huiles (1,25 % dans l'huile d'olive). Cette solubilité dans les lipides explique sa possible pénétration cutanée et son affinité pour le tissu nerveux. Cet élément est extrêmement inflammable à l'air aussi doit-on le conserver sous eau et éviter de le manipuler, autant que possible, au contact de l'air. La moindre élévation de température, sous l'influence du frottement par exemple, suffit à provoquer son inflammation.

Le phosphore blanc est métastable et se transforme lentement sous l'influence de la lumière ou de la chaleur en une variété allotropique stable, le phosphore rouge, dont les propriétés physico-chimiques et biologiques sont très différentes.

La propriété chimique marquante du phosphore blanc est son pouvoir réducteur intense, et par conséquent, son avidité pour l'oxygène. A l'air, il s'oxyde spontanément en anhydride phosphorique P_2O_5 en émettant une lueur verdâtre, c'est le phénomène de "phosphorescence" auquel le phosphore blanc doit d'ailleurs son nom et sur lequel est basée une méthode de recherche sensible de ce toxique (192). La phosphorescence ne se produit ni aux températures inférieures à + 6°C, ni dans le vide ou dans une atmosphère de gaz inerte. Elle est inhibée par un très grand nombre de corps : l'anhydride sulfureux, l'hydrogène sulfuré, l'ammoniac, l'éthylène, l'oxyde de carbone, l'éthanol, l'éther éthylique, le pétrole et l'essence de térébenthine, le benzène, le goudron et le sulfure de carbone.

Le phosphore blanc réagit violemment avec l'acide nitrique fumant en donnant de l'acide orthophosphorique ; les autres oxydants, notamment le permanganate de potassium et le chlorate de potassium, conduisent au même résultat.

Les sels de métaux lourds ou précieux : argent, or, cuivre, sont réduits avec précipitation du métal ou du phosphore selon les proportions des corps mis en présence. Dans le cas du nitrate d'argent il se produit un noircissement qui n'est malheureusement pas spécifique puisqu'il est observé également avec l'hydrogène sulfuré.

Le phosphore blanc se combine à presque tous les métalloïdes (fluor, chlore, brome, iode, soufre, arsenic, sélénium, bore) et réagit avec les métaux en donnant des phosphures.

Envisager les emplois du phosphore blanc, c'est évoquer les diverses causes d'intoxication par cet élément, sujet que nous allons aborder au cours du chapitre suivant.

CHAPITRE SECOND

TOXICOLOGIE DU PHOSPHORE BLANC

I- ETIOLOGIE DES INTOXICATIONS

A- Historique - Fréquence des intoxications

Avant l'invention des allumettes chimiques à friction par Charles SAURIA en janvier 1831 et la mise au point de leur fabrication industrielle par le Wurtembergeois Jean-Frédéric KAMMERER en 1832, l'usage du phosphore blanc comme poison était à peu près inconnu en France (LADREY, 244).

Débuta alors une période qui voit le nombre des intoxications criminelles par le phosphore blanc augmenter progressivement, à tel point que l'utilisation du phosphore blanc dans les tentatives d'empoisonnement rejoint en 1856 celle de l'arsenic, puis la dépasse en 1857 et 1858.

Cet emploi préférentiel du phosphore blanc était dû à la facilité d'accès à ce toxique (allumettes) et sa mise en évidence tardive plus difficile que celle de l'arsenic. C'est ainsi que pendant une période de cinquante ans en France, entre 1845 et 1895, 342 empoisonnements criminels par le phosphore ont été observés, avec une fréquence maximum (94 cas) entre 1856 et 1860 (BROUARDEL, 66).

Le nombre des intoxications a ensuite suivi une courbe décroissante pour n'atteindre qu'un à deux cas par an à la fin du 19^e siècle par suite du remplacement du phosphore blanc par le phosphore rouge ou le sesquisulfure de phosphore P_4S_3 dans la fabrication des allumettes.

Il est en effet frappant de constater la différence de toxicité entre deux variétés allotropiques du même élément. Le phosphore rouge est, contrairement au phosphore blanc, pratiquement atoxique ; les seuls accidents observés consistant en des brûlures (SEDLACEK, 353).

Une diminution semblable des cas a été observée à l'étranger (RUBISTSKY & MYERSON, 333, CAMERON & RENTOUL, 80) sauf dans les pays où l'utilisation des allumettes phosphorées n'a pas été interdite (VOGT, 391, KIANG, 235, READ, 314) et dans ceux où le phosphore était utilisé dans un but abortif, en Suède notamment (66).

A l'heure actuelle, la fréquence des intoxications phosphorées ne dépasse pas, en moyenne, un à deux cas par an, (FREJAVILLE, 161, PALIARD & coll. 300) et est due à l'ingestion de pâte phosphorée raticide.

Nous allons envisager de façon plus détaillée les diverses étiologies de l'intoxication par le phosphore blanc, aussi bien aiguë que chronique (phosphorisme).

B- Intoxications aiguës

Les intoxications aiguës provoquées par le phosphore blanc recouvrent les deux grands types classiques d'intoxication : les intoxications volontaires d'une part et les intoxications accidentelles d'autre part.

Ces diverses intoxications peuvent être dues à l'absorption du phosphore blanc sous des formes variées et c'est par l'étude de celles-ci que nous les envisagerons.

Ces formes de présentation sont au nombre de cinq :

- les allumettes chimiques à friction,
- les pâtes phosphorées utilisées pour la destruction des animaux nuisibles, notamment les rongeurs,
- les pétards, amorces, artifices et divers jouets à détonation contenant du phosphore blanc,
- les grenades et bombes au phosphore blanc,
- les huiles phosphorées médicinales.

1- Les allumettes chimiques à friction

Les premières allumettes chimiques avaient leur tête constituée par une pâte contenant du phosphore blanc, un agent comburant (chlorate de potassium), de la gomme, de la gélatine ou de la colle et un colorant. On comprend aisément que les allumettes, présentes dans tous les foyers, et donc à portée de chacun, aient pu provoquer, dans la deuxième partie du siècle dernier, de nombreuses intoxications aussi bien criminelles, volontaires : suicides (HENRY & CHEVALLIER, 207, 208) ou emploi comme abortif (235), qu'accidentelles (207, 208).

Mais devant les différents risques encourus aussi bien par le public (intoxications, incendies volontaires ou accidentels) que par les ouvriers de fabriques d'allumettes (intoxications, brûlures) on a vite cherché, notamment à la suite des mémoires de CAUSSE et de CHEVALLIER (87, 90), à supprimer le phosphore blanc de celles-ci. Déjà en 1853, Carl Frans LUNDSTRÖM avait eu l'idée de substituer le phosphore rouge (amorphe) au phosphore blanc, ce qui conduira à la mise au point des allumettes dites "suédoises".

D'autre part, la fabrication des allumettes en France, longtemps libre, fut frappée après 1870 d'une taxe à la vente puis trans-

formée en monopole affermé qui fut pris en régie directe par les manufactures de l'Etat en 1890. Maintenant, le régime financier est commun avec celui du tabac depuis le décret-loi de 1935 créant le Service d'Exploitation Industrielle des Tabacs et des Allumettes (S.E.I.T.A.).

Cet ensemble de faits a eu pour conséquence de provoquer, à partir de 1880, une régression extrêmement marquée du nombre des intoxications phosphorées et, à l'heure actuelle, si l'on peut observer encore des accidents provoqués par les allumettes, ils n'ont plus de rapport avec le phosphore blanc.

Les allumettes actuelles sont de deux sortes :

- les allumettes de "ménage" dont la tige, préalablement soufrée, est enduite d'un mélange inflammable composé de sesquisulfure de phosphore, de chlorate de potassium, d'oxyde de zinc, d'un abrasif (verre en poudre ou silice), de colle et un colorant (éosine ou rhodamine) ; ces allumettes s'enflamment sur n'importe quel frottoir rugueux (généralement du papier de verre),
- les allumettes "de sûreté", longtemps appelées "suédoises", dont l'extrémité de la tige est d'abord paraffinée avant de recevoir un bouton constitué par du chlorate de potassium, du bichromate de potassium, du trisulfure d'antimoine, de l'oxyde de zinc, du verre en poudre, de la colle et un colorant ; ces allumettes nécessitent, pour s'enflammer, un frottoir spécial dont le grattoir est constitué par un mélange de phosphore amorphe (rouge), de poudre de verre et de colle.

Ces deux types d'allumettes ne donnent que rarement lieu à des accidents qui sont marqués par des dermatites (BILANCIA, 33, IVE, 221), des brûlures et des signes digestifs en cas d'ingestion (HALL, 199).

2- Les pâtes phosphorées

Responsables d'intoxications aiguës presque aussi nombreuses que celles observées avec les allumettes (207, 208), les pâtes phosphorées ont constitué, après la disparition progressive du phosphore blanc de ces dernières, la principale forme d'absorption de ce toxique aussi bien lors d'intoxications criminelles : (THOMAS, 378), de suicides (201, 330, 374, 121, 91, 289, 333, 131, 222, 398, 118, 119, 25, 75, 68, 224, 225, 80, 151, 189, 107, 307), de tentatives d'avortement (401, 308), que d'intoxications accidentelles observées surtout chez les enfants (268, 269, 41, 333), mais également, à la suite de confusions, chez les vieillards (CRANE & coll 106) ; on a pu même noter des intoxications accidentelles indirectes consécutives à l'ingestion de certains animaux ayant absorbé une pâte phosphorée (THERON, 377).

Ces pâtes phosphorées constituent, actuellement en France, la principale source d'intoxication phosphorée dont la motivation essentielle est le suicide.

3- Les pétards, amorces, artifices et divers jouets à détonation contenant du phosphore blanc

Ce sont les "Spit-Devil", "sun-of-a-gun" américains, "Phaõ-Chà" vietnamiens, "totes et diablitos" colombiens, "saltapericos" vénézuéliens, dont l'utilisation à des fins de suicide est rencontrée aux Etats-Unis (LA DUE & coll. 243), au Viet-Nam (BLONDEL & coll. 38), en Colombie (FRANCO-QUEVEDO, 155), et au Vénézuéla (SALFELDER & SEELKOPF, 335). Ces préparations peuvent être également à l'origine d'intoxications accidentelles, essentiellement chez les enfants (367, 104, 306, 136, 216, 333, 155).

4- Les grenades et bombes au phosphore blanc

On peut observer des intoxications accidentelles lors de la préparation des bombes au phosphore blanc (READ & WHITE, 315) ou à la suite de l'explosion de grenades au phosphore (SUMMERLIN & coll. 371).

5- Les huiles phosphorées médicinales

Elles ont été responsables d'intoxications accidentelles d'origine thérapeutique, notamment sous forme d'huile de foie de morue phosphorée trop concentrée (affaire METIVIER, 138, BROUARDEL & VIBERT, 67). Cette étiologie a aujourd'hui disparu.

Il nous faut enfin signaler que le phosphore blanc en nature peut être à l'origine d'intoxications aiguës en milieu industriel (MOLE & coll. 283).

Mais outre ces intoxications aiguës, le phosphore blanc est capable de provoquer des intoxications à long terme.

C- Intoxications à long terme

Les intoxications thérapeutiques résultant de l'administration répétée d'huile de foie de morue phosphorée comme antirachitique et antiscrofuleux (SONTAG, 364) n'ont qu'un intérêt historique. La seule intoxication à long terme rencontrée de nos jours, assez rarement d'ailleurs, est d'origine professionnelle : c'est le phosphorisme que l'on peut observer chez les ouvriers affectés à la préparation, la manipulation et l'emploi du phosphore blanc dans l'industrie. Sa description est ancienne (379) et le principal signe clinique est une

nécrose osseuse localisée notamment au niveau du maxillaire (TRELAT, 379, MAHU, 270, MICHAELIS, 282, HEIMANN, 206, LESKY, 253). Devant les risques d'accidents de toutes sortes et en raison de la toxicité du phosphore blanc, il n'est pas surprenant que sa fabrication, sa circulation, sa vente et ses emplois soient soumis à la surveillance de l'administration des Contributions Indirectes (Loi du 18 avril 1895, décret du 19 juillet 1895).

II- SYMPTOMATOLOGIE DES INTOXICATIONS AIGUES

Nous envisagerons son étude en considérant d'une part les signes cliniques et biologiques et le traitement de l'intoxication humaine et, d'autre part, les modifications biologiques observées chez l'animal.

A- INTOXICATIONS HUMAINES

Avant d'aborder leur description il nous faut tout d'abord rappeler que la dose léthale minimale est voisine de 1mg de phosphore blanc par Kg de poids corporel (243, 333, 131, 61) et que la dose toxique, c'est-à-dire la dose minimale susceptible d'entraîner des manifestations cliniques, est de l'ordre de 0,3mg par kg (333, 61).

Le tableau clinique de l'intoxication est fonction de la quantité de phosphore blanc ingérée et de la vitesse d'absorption du toxique, la présence d'alcool (131) et de lipides (61) pouvant l'accélérer ; c'est ainsi que l'on peut observer deux formes cliniques : une forme suraiguë et une forme aiguë.

1- L'intoxication suraigüe

Constamment mortelle, est consécutive à l'ingestion d'une quantité massive de phosphore blanc, supérieure à 1,50g ; l'évolution est alors foudroyante, la mort survient en quelques heures, six à douze heures rarement plus de vingt-quatre heures, dans un tableau de coma et d'insuffisance circulatoire aigüe (402, 243, 333, 131, 290, 38, 224) avec parfois des troubles électrocardiographiques de la conduction et de l'excitabilité (132). Certains sujets présentent une cyanose des muqueuses et une peau cendrée et pâle (131). On ne note, par contre, aucun signe d'atteinte hépatique. Avant la mort, on peut observer une agitation puis une phase de psychose toxique avec manifestations maniaques (131).

2- L'intoxication aigüe

L'intoxication aigüe proprement dite est plus fréquente et résulte de l'ingestion d'une quantité moins importante de phosphore blanc (généralement inférieure à 1,50 g). Elle évolue en trois phases (121, 333, 61, 80, 335).

La première phase est une phase d'irritation gastrointestinale débutant généralement trente minutes à une heure après l'ingestion et au cours de laquelle on note une odeur alliacée de l'haleine, des éructations phosphorescentes, visibles dans l'obscurité, une sensation de constriction douloureuse de l'arrière-gorge, le long de l'oesophage et au niveau de l'épigastre. Apparaissent alors des nausées, des vomissements d'odeur alliacée, phosphorescents à l'obscurité, souvent sanglants, qui permettent l'élimination d'une quantité importante du toxique et dont l'absence ou le retard sont des éléments

de mauvais pronostic (243) ; ils sont accompagnés de douleurs abdominales et assez fréquemment de diarrhée abondante. A ce stade, on peut observer des manifestations nerveuses consistant en des mouvements convulsifs des bras et des jambes dont l'extension est difficile, puis une raideur (10) et, dans les cas d'absorption de quantités importantes de phosphore, des modifications électrocardiographiques marquées principalement par des variations de l'onde T (114, 289, 132, 307) ; ces signes d'atteinte cardiaque apparaissent plus tardivement, au cours de la troisième phase, si la dose ingérée est plus faible.

A cette phase initiale, dont la durée n'excède pas généralement vingt-quatre heures, fait suite une période de rémission pratiquement asymptomatique. Cette phase de latence, signalée depuis fort longtemps (141, 10) est extrêmement trompeuse car elle peut faire croire à la guérison du sujet, à tel point qu'elle a amené certains criminels à faire ingérer à nouveau le toxique (378) ou certains candidats au suicide à utiliser un autre moyen (121, 196). La durée de cette rémission est fonction de la vitesse avec laquelle le phosphore blanc est absorbé ; elle varie de quelques heures à quelques jours.

Survient enfin la phase terminale qui correspond à la manifestation des effets toxiques généraux du phosphore blanc. Tout d'abord les nausées et les vomissements réapparaissent, accompagnés de douleurs abdominales et de diarrhée. On note d'autre part :

- des manifestations nerveuses marquées par une agitation, des céphalées, un délire et une démence toxiques puis une dépression et un coma ;
- des signes d'atteinte rénale : hyperazotémie transitoire, oligurie, hématurie, protéinurie, pyurie, glycosurie (107), diminution progressive de l'excrétion de l'azote total, mais hyperaminoacidurie

(106). Ces signes rénaux sont beaucoup plus importants chez les sujets brûlés par le phosphore blanc qui montrent un tableau d'hémolyse massive avec hémoglobinurie, hématurie et oligurie (371).

- Exceptionnellement une gangrène symétrique des pieds (330).

A cette période c'est essentiellement l'atteinte hépatique qui domine : le foie est hypertrophié, très mou ; le sujet est ictérique, manifeste une tendance aux hémorragies muqueuses et internes, par suite d'une hypothyroïdémie avec parfois apparition d'hémorragies sous-cutanées (201).

Sur le plan biologique, on constate d'assez nombreuses anomalies : une hypoglycémie avec acidose, reflets des troubles du métabolisme du glycogène, une hyperbilirubinémie, une hypofibrinogénémie, une hyposidérémie, une augmentation précoce de la transaminase glutamopyruvique sérique (359), traduisant l'atteinte hépatique. Le métabolisme phosphocalcique paraît modifié car l'on observe : une hyperphosphorémie (398), une hypercalciurie et une hyperphosphaturie (107). L'examen hématologique montre une augmentation des hématies et assez souvent une lymphocytose (289, 131, 132).

Bien que la mort puisse intervenir à ce stade, par suite d'un collapsus vasculaire périphérique (131, 132) ou d'une gastrite corrosive intense (225), c'est en général surtout le degré de l'insuffisance hépatocellulaire qui détermine le pronostic. Celle-ci peut alors se poursuivre vers la mort (200, 367, 136, 306, 374, 269, 216, 401, 406, 86, 222, 119, 68, 106, 308) ou vers la guérison (268, 58, 91, 25, 75, 151, 189).

La mort peut survenir quatre à dix jours après le début de l'intoxication, à la suite d'un coma ou d'une hémorragie interne. Dans

les séries importantes de cas publiés, la mortalité oscille entre 16p100 (336) 25p100 (243) et 50p100 (333, 131, 38, 155, 307).

La guérison est marquée par une amélioration clinique progressive, généralement complète, selon la dose absorbée, en sept à quatorze jours ; l'hépatomégalie peut persister jusqu'à trente jours après le début de l'intoxication. Cependant, dans certains cas, des séquelles sont constatées. C'est ainsi que dans le cas d'une intoxication aiguë chez un enfant de huit mois, BLUMENTHAL et LESSER (41) ont observé une bande phosphorée ("Phosphorchicht") plus d'un mois après l'intoxication et qui consistait en des lignes denses de croissance au niveau des extrémités proches des lignes épiphysaires. D'autre part, les intoxications aiguës, de même d'ailleurs que les intoxications chroniques, peuvent avoir comme suite des paralysies se présentant sous la forme de polynévrites accompagnées de douleurs, de paresthésies et de troubles de la sensibilité des parties paralysées (112).

A l'examen anatomo-pathologique, l'ensemble de l'appareil digestif présente un aspect hémorragique et nécrotique, avec, en particulier, une nécrose aiguë de l'oesophage et de l'estomac qui peut même, parfois, être l'objet d'une perforation, (398), une suffusion sanguine extrêmement importante des séreuses (378). On note également la présence d'une quantité considérable du contenu gastrique dans les voies respiratoires (378), qui peut être responsable d'un oedème et d'une congestion pulmonaire (398). On relève enfin une dégénérescence graisseuse et une nécrose de différents organes (141) rein, coeur, muscles striés, rate et surtout foie qui constitue le principal centre d'intérêt lors de cette intoxication.

Le foie est généralement hypertrophié, mou, jaune avec des hémorragies superficielles (80). Cette teinte jaune est le témoin de la dégénérescence graisseuse subie par cet organe, observée en France

pour la première fois en 1855 par MARCHAND (cf 163) et dont la localisation est périlobulaire (209, 131, 335), ce qui permet de la différencier, notamment, de la stéatose centrolobulaire provoquée par l'Amanité Phalloïde (170, 375) et par les dérivés halogénés des hydrocarbures aliphatiques, en particulier, le tétrachlorure de carbone (276, 284). Une description très complète des différents aspects histologiques du foie observés lors de l'intoxication phosphorée a été faite récemment par CAROFF & coll.(83).

Avant d'aborder l'étude de l'intoxication expérimentale chez l'animal rappelons les grandes lignes du traitement de l'intoxication aigüe humaine.

3- Traitement

Le traitement de l'intoxication phosphorée est essentiellement préventif. L'absorption du phosphore blanc par l'intestin étant en effet relativement lente, l'évacuation précoce du toxique permet une prévention efficace des manifestations cliniques. Elle peut être réalisée par les voies digestives hautes et basses.

L'élimination par voie haute est assurée par des lavages d'estomac avec une solution de permanganate de potassium à un pour mille, qui oxyde le phosphore blanc en acide orthophosphorique peu toxique, ou avec une solution de sulfate cuivrique à deux pour mille qui insolubilise le phosphore blanc sous forme de phosphure de cuivre (61, 13) : ce lavage doit être effectué même si le sujet est dans le coma, à condition de pratiquer préalablement une intubation trachéale.

Cette élimination par voie haute peut être éventuellement complétée par une élimination par voie basse qui fait appel à l'utilisation

de magnésie (ORFILA cité par SCHUCHARDT, 347, REVEIL, 320, COULOMB 105, BOCIAN, 42) ou d'huile de paraffine ou de vaseline, expérimentée par ATKINSON en 1921 chez le chien (15) et qui est parfois encore utilisée comme solvant pour prévenir l'absorption du phosphore blanc et pour accélérer son élimination (224, 13, 42).

L'utilisation comme antidote de l'essence de térébenthine, préconisée par J. PERSONNE en 1869 (303) à la suite d'expériences chez le chien et utilisée chez l'homme par VETTER (389), ANDANT (10), et RONDOT (328) notamment, n'a plus cours que très rarement (195) ; elle agissait par l'oxygène qu'elle fixe sous forme d'ozonides en oxydant le phosphore et en se combinant avec les produits d'oxydation (153).

Le deuxième temps du traitement consiste à compléter l'élimination précédente par une soustraction du toxique circulant par exsanguino-transfusion qui modifie radicalement l'intensité des lésions hépatiques à condition d'être réalisée avant la huitième heure qui suit l'ingestion (279, 360).

Le dernier temps du traitement est représenté par une thérapeutique symptomatique qui doit avoir essentiellement pour but de protéger le foie par perfusion de soluté glucosé hypertonique (91, 13) et de glutamate d'arginine (189). Seront administrés en outre, de la vitamine K et du gluconate de calcium pour lutter contre les hémorragies (91, 13) et des vitamines B₁ et C. Sur le plan diététique, on instaurera, dès que possible, un régime riche en glucides et pauvre en lipides (91, 134).

Contre le collapsus circulatoire périphérique, on peut administrer de la noradrénaline (75).

Enfin, dans le cas de brûlures provoquées par le Phosphore blanc, il faut dans un premier temps imprégner la zone brûlée avec une solution alcaline cuprique qui d'une part inactive le phosphore et d'autre part le rend facilement visible ; il faut ensuite retirer le plus rapidement possible toute parcelle de phosphore et, éventuellement, exciser largement après anesthésie locale, pour limiter au maximum la pénétration cutanée du toxique (295,266).

B- OBSERVATIONS EXPERIMENTALES

Nous envisagerons successivement les modifications biologiques provoquées par l'intoxication phosphorée, puis les modifications anatomopathologiques en insistant plus particulièrement sur les phénomènes observés au niveau du foie qui est l'organe principalement atteint.

1- Etude biologique

a- Toxicité - Répartition - Clinique

Le phosphore blanc, administré par sonde oesophagienne en solution dans l'huile d'arachide, est toxique aux doses de 0,5mg chez la souris, 3,5mg chez le rat et 20 mg chez le lapin (CAMERON & PATRICK, 78) ce qui correspond sensiblement à des doses de 25mg/Kg (souris), 17,5mg/kg (rat) et 11mg/Kg (lapin). Chez le cobaye, les expériences de FROMMEL & coll. (166) permettent d'estimer la dose toxique à 25mg/ Kg environ. Pour ce qui est de la toxicité par voie cutanée, les expériences de HURKA (217), chez le cobaye, indiquent que le phosphore à la dose de 0,4 à 0,6g/Kg, est à peine résorbé par la peau intacte et rasée ; par contre, en implantation, une dose

deux fois moindre provoque une intoxication évidente au bout de neuf jours ; mais si l'on immerge le phosphore pendant trente secondes dans une solution de sulfate cuivrique, on n'observe pas d'intoxication. Cette action protectrice du sulfate cuivrique est mise à profit, en thérapeutique humaine, pour neutraliser le phosphore lors d'intoxication aussi bien par voie buccale que par voie cutanée.

L'utilisation de phosphore marqué (^{32}P) par CAMERON & PATRICK (79), aux doses toxiques précédemment indiquées, a montré que cet élément était fixé avec une intensité assez importante par le foie, le cortex rénal et surrénal, l'épiderme, la muqueuse intestinale et le pancréas, avec une intensité moyenne par l'ovaire, la medulla rénale et surrénale, le myocarde, le thymus, le poumon, et peu fixé par le muscle strié, le cerveau, les lipides et les os.

La plus grande partie de la radioactivité est associée, dans le cas du foie, du rein et du coeur, au résidu sec, et, dans le cas du cerveau, aux fractions extractibles (fractions hydrosolubles et liposolubles). Il faut noter qu'à des doses plus faibles, la fixation la plus importante se produit au niveau des os (238).

L'étude clinique des animaux est difficile ; on note essentiellement des signes nerveux et gastro-intestinaux (63), une diminution du flux sanguin et une insuffisance cardiaque (281), des troubles respiratoires (167) et une chute de poids importante (166). Au point de vue hématologique, on note une augmentation du nombre des monocytes (252).

b- Phosphore blanc et métabolisme azoté et protidique

Les incidences de l'intoxication phosphorée aigüe sur les échanges azotés ont suscité des travaux nombreux et contradictoires, les

plus anciens étant, semble-t-il, ceux de STORCH en 1865 (cité par RETTIG, 319) qui avait constaté une augmentation de l'élimination de l'urée chez le chien, retrouvée également par BAUER en 1871 et 1878 (24). Cette observation a été contestée par FALCK (142), mais des travaux ultérieurs ont montré que le phosphore blanc provoquait chez cet animal, une diminution de l'azote uréique urinaire et une augmentation nette de l'azote monoaminé, plus discrète de l'ammoniac (305, 147, 275).

Les observations de ISHIHARA (219) sont plus nuancées car il ne trouve pas de changement notable dans la distribution de l'azote entre la créatine, la créatinine, les acides aminés et l'ammoniac. Ceci semble confirmé par VAN SLYKE (386) qui n'a pas trouvé d'augmentation de l'excrétion des acides aminés. Par contre celle-ci a été observée, par ABDERHALDEN & BERGELL (1) chez le lapin et le chien et par WOHLGEMUTH (411) chez l'homme et le chien. Elle est multipliée par cinq à la suite de l'administration de glycine aux chiens intoxiqués, contrairement aux animaux témoins (226). Cette aminoacidurie serait la conséquence, pour LUSK (261) de l'accumulation d'acide lactique dans les tissus. Mais les recherches expérimentales de DESQUEROUX (122) chez le lapin et le cobaye semblent bien établir que lors de l'intoxication phosphorée, il se produit une diminution du coefficient azoturique $\left(\frac{N \text{ urée}}{N \text{ total}} \right)$ accompagnée presque toujours par une augmentation du rapport $\frac{\text{azote aminé}}{\text{azote total}}$, l'association de ces deux variations étant la conséquence, pour cet auteur, de l'atteinte hépatique grave. Il en résulte, au niveau du sang, une augmentation de l'azote non protéique, déjà observée, d'ailleurs, par MARSHALL & ROWNTREE (275) portant proportionnellement davantage sur l'azote formol-titrable (azote aminé et ammoniacal), et une augmentation de la guanidine (108). L'augmentation de l'azotémie est, par contre, la conséquence de l'insuf-

fisance rénale (122) de même, vraisemblablement, que celle de l'uricémie (408).

Au niveau tissulaire, JACOBY (223) a mis en évidence la présence de leucine et de tyrosine dans le foie de chien intoxiqué, sacrifié dans les instants précédant la mort. DESQUEROUX (122) observe une augmentation du pourcentage de l'azote aminé dans le foie, le rein, le muscle, et une hausse constante, mais moindre, du pourcentage de l'azote uréique dans le foie qui semble avoir perdu en grande partie, sous l'action du phosphore, le pouvoir de métaboliser les acides aminés et de les faire participer à la néo-glycogénèse (156, 122).

Cette accumulation d'acides aminés peut être attribuée soit à un catabolisme protidique accru (275) soit plutôt, à une altération de la biosynthèse des protéines par le foie puisque le phosphore blanc provoque une diminution de l'incorporation des acides aminés dans les protéines hépatiques (22, 352) ; c'est ce dernier processus qui permettrait d'expliquer la chute du fibrinogène observée depuis longtemps au cours de l'intoxication phosphorée chez le chien dont le sang est incoagulable (223, 404, 275).

Cette déficience du fonctionnement hépatique peut être révélée par la chute de l'excrétion fécale des phtaléines qui apparaissent dans les urines (404, 275) et par l'épreuve à la bromosulfonephtaléine (103).

c- Phosphore blanc et métabolisme glucidique

Le phosphore blanc provoque une diminution du glycogène hépatique (329, 287) ; le glycogène quitte le foie sous forme de glucose

qui est catabolisé à son tour, ce qui entraîne deux conséquences : d'une part une diminution progressive de la glycémie qui devient presque nulle au moment de la mort comme l'ont observé FRANK & ISAAC (156) chez le lapin, DESQUEROUX (122) chez le lapin et le cobaye, WILLIAMSON (408) chez le rat ; d'autre part une excrétion urinaire abondante d'acide lactique (156). Enfin, autre conséquence de l'insuffisance hépatique, on observe une diminution de la tolérance au galactose, au fructose et au glucose (Travaux de MARSHALL & ROWNTREE, 275, et de BODANSKY, 43, chez le chien ; d'ALTHAUSEN & THOENES, 9, chez le lapin).

d- Phosphore blanc et métabolisme énergétique

Le phosphore blanc provoque une augmentation de la consommation en oxygène et de la production de corps cétoniques dans la cellule hépatique (76 , 139). Cette augmentation de la consommation en oxygène s'accompagne, au niveau des mitochondries, d'une inhibition de la phosphorylation oxydative, due à une déficience du "système" $ADP + P \longrightarrow ATP$ (125). Il est à noter que ce découplage de la phosphorylation oxydative est également observé pour les homogénats et les mitochondries hépatiques de rats normaux préparés avec de l'eau distillée (125). Ce même auteur a trouvé d'autre part (126) une chute marquée des pyridine-nucléotides dans le foie des animaux intoxiqués, notamment au niveau des mitochondries, chute s'accompagnant d'un abaissement du rapport $\frac{\text{Pyridine nucléotides oxydées}}{\text{Pyridine nucléotides réduites}}$, et, avec VITI (130) une diminution du cytochrome c hépatique (l'augmentation trouvée par PRADER, 310, résulte, vraisemblablement d'artefacts méthodologiques) et enfin une diminution de l'ATP (127). Tous ces phénomènes peuvent être rapportés au gonflement des mitochondries que l'on observe au cours de l'intoxication phosphorée (128) et qui traduirait une augmentation de leur perméabilité (127). Il faut noter,

cependant, que le découplage de la respiration et de la phosphorylation n'est pas toujours observé (288).

e- Phosphore blanc et métabolisme lipidique

Le phosphore blanc provoque la stéatose hépatique, c'est-à-dire l'accumulation de lipides au niveau du foie chez le lapin (319), le chien (228), le rat (31), et le cobaye (127). La souris se révèle, par contre, assez résistante à l'action de ce toxique puisque l'on observe pas, même à doses élevées, d'atteinte hépatique significative chez cet animal (103).

Cette augmentation des lipides hépatiques est due surtout à l'accumulation de triglycérides (258). Elle est accompagnée par une diminution des activités estérasique (228 , 76) et lipasique (CALIFANO, 76), cette dernière n'étant pas observée à des doses faibles (135, 340), un abaissement de l'oxydation de l'octanoate (129) et de tous les acides gras en général (77). Au niveau sanguin, le phosphore blanc provoque une chute des triglycérides (258) du cholestérol total (352), des lécithines (285) et une augmentation de l'activité lipolytique (404, 275) et estérasique, laquelle n'est pas due à la destruction des cellules hépatiques (228, 331). Quant aux phospholipides, les données expérimentales à leur sujet sont contradictoires, DEL MONTE & FONNESU (116) estimant leur synthèse hépatique diminuée tandis que SEAKINS & ROBINSON (352) la trouvent normale.

Devant la multiplicité et la gravité des modifications biologiques provoquées par le phosphore blanc, différents chercheurs ont tenté de voir s'il n'existait pas des moyens de modifier, voire d'annuler la toxicité de cet élément, notamment au niveau d'un organe qui est particulièrement sensible à son action, le foie.

f- Facteurs modifiant la toxicité du phosphore blanc

Les facteurs susceptibles de modifier la toxicité du phosphore blanc peuvent être classés en deux grandes catégories : les facteurs nutritionnels et les facteurs hormonaux.

α- Facteurs nutritionnels :

Régime :

RETTIG (319) a constaté qu'un régime riche en glucides protège le foie du chien et du lapin contre l'intoxication phosphorée, diminuant l'infiltration graisseuse et prévenant l'augmentation de l'élimination azotée. OPIE & ALFORD (296, 297) ont montré que si le degré de l'atteinte hépatique provoquée par le phosphore blanc chez le rat était accru avec un régime riche en graisses, la mortalité et l'intensité de la nécrose hépatique étaient moindres dans le cas d'un régime riche en glucides.

Vitamines :

L'administration de vitamines du groupe B, dont on connaît le rôle dans le métabolisme des glucides, diminue la toxicité du phosphore et prévient, dans une certaine mesure, l'altération du parenchyme hépatique du lapin et du cobaye (148). De même, la "vitamine F" empêche la mort de ces mêmes animaux soumis à des doses de phosphore qui sont normalement léthales (118, 146). Par contre bien que le phosphore provoque une diminution importante de la teneur en vitamine C du foie et des surrénales, cette vitamine ne protège pas contre l'intoxication par cet élément (166).

Substances lipotropes :

BEST & coll (31) ont montré que si la choline, dont l'excrétion urinaire est augmentée lors de l'intoxication phosphorée (11), n'inhibait pas le dépôt de graisses provoqué par le phosphore, elle favorisait, cependant, la régénération. L'effet protecteur de la

choline est beaucoup plus marqué dans l'intoxication chronique puisqu'elle prévient, à la dose de 200mg/kg la stéatose hépatique provoquée par le phosphore blanc (CATOLLA-CAVALCANTI, 84) ; il en est de même de l'acide pantothénique à la dose de 50mg/kg (CATOLLA-CAVALCANTI & LEVIS, 85) ; l'association de mésoinositol à doses suffisantes (500mg/kg) avec chacun de ces deux corps permet de réduire les doses de moitié pour un effet protecteur encore plus total (84, 85).

Enzymes :

L'administration de préparation d'enzymes hépatiques (estérase, choline-oxydase, arginase) à des rats, prévient la dégénérescence vacuolaire et la lipophanérose provoquées par le phosphore ; cette action est très supérieure à celle de l'extrait antianémique de foie sans enzymes (173). Ces différences se retrouvent au niveau de la respiration du tissu hépatique qui est normale et même augmentée, selon les substrats, dans le cas des animaux intoxiqués ayant reçu la préparation enzymatique (174). Celle-ci prévient, d'autre part, la diminution de l'activité cholinoxydase provoquée par le phosphore (175).

L'administration intraveineuse d'ubiquinone, à des rats, prévient la stéatose provoquée par le phosphore (123). Nous aurons l'occasion ultérieurement de revenir sur ce sujet.

Autres composés :

L'adénine est sans influence sur la stéatose provoquée par le phosphore blanc chez le rat (143).

β - Facteurs hormonaux :

C'est surtout l'influence des surrénales qui a été étudiée au cours de l'intoxication phosphorée. Si LASZT & VERZAR, en 1936 (250), avaient conclu à une prévention de la stéatose phosphorée par la surrénalectomie, il semblerait plutôt que celle-ci n'exerce pas d'effet protecteur (2).

2- Etude anatomo-pathologique

A l'autopsie, les animaux ont un aspect voisin de celui que présente l'homme, mais la tendance à l'hémorragie est moins marquée (78). On observe donc des hémorragies extensives du tractus gastrointestinal, des dépôts graisseux accompagnés d'une nécrose des reins et du foie ; la rate est hypertrophiée et contient des dépôts d'hémosidérine (150, 70). On peut noter, également, un épaississement de la ligne épiphysaire du tissu osseux jeune (150).

C'est incontestablement le foie qui a retenu surtout l'attention des chercheurs. Classiquement, cet organe est le siège d'une stéatose périlobulaire (275, 211). En fait, chez le rat recevant par voie intrapéritonéale le phosphore blanc en solution huileuse, à la dose de 5mg/kg, cette stéatose débute, vers la douzième heure, dans les zones périportales du lobule et progresse vers la veine centro-lobulaire pour affecter la totalité du lobule en trois à quatre jours (127) ; ce dernier délai est plus court avec des doses plus élevées administrées par voie buccale (176). Les lésions peuvent ensuite évoluer soit vers la nécrose avec, parfois, l'installation d'une cirrhose, que l'on peut observer également à la suite de l'administration chronique de phosphore (273), soit vers la guérison, la régression des lésions se faisant de la veine centro-lobulaire vers la périphérie pour être complète aux environs du vingtième jour (227).

A l'échelle cellulaire, cette stéatose a surtout son siège dans le hyaloplasme ; on peut observer, en effet, au microscope électronique, de très nombreuses gouttelettes graisseuses de toute taille, les plus grosses étant généralement situées dans les plages du hyaloplasme d'aspect feutré (227).

Si les mitochondries sont morphologiquement très résistantes à l'intoxication phosphorée (227) , on peut cependant observer un gonflement de ces organites à partir de la vingt-quatrième heure (227, 176) et ce n'est qu'aux stades ultimes de l'évolution que l'on observe des images de lyse (227).

Le noyau est relativement résistant à l'action du phosphore ; CLARA (94) avait constaté une augmentation du nombre des cellules binucléées. D'autre part, ce n'est qu'assez tardivement que l'on observe une diminution de la chromatine (176).

Le réticulum endoplasmique est, par contre, beaucoup plus sensible à l'action du toxique ; c'est ainsi que très récemment GANOTE & OTIS (169) ont constaté aux premiers stades de l'agression, soit au bout de vingt-quatre heures, une augmentation marquée de l'ergastoplasme persistant à la quarante-huitième heure, les membranes ergastoplasmiques formant souvent des lamelles concentriques autour du noyau ou des autres structures cytoplasmiques. Le réticulum endoplasmique lisse est par contre normal à la vingt-quatrième heure et forme des amas dans le cytoplasme à la quarante-huitième heure ; parallèlement se produit une diminution des polysomes et des ribosomes.

Ces deux auteurs ont également noté quelques modifications au niveau de l'appareil de Golgi, consistant en une diminution, au bout de vingt-quatre heures, puis en la disparition des particules denses présentes dans les citernes de Golgi qui sont, de plus, généralement dilatées.

L'intoxication phosphorée est donc une intoxication grave, aussi bien chez l'homme que chez l'animal, elle atteint de façon tout à fait privilégiée, bien que non spécifique, un organe, le foie, et nous nous sommes arrêtés à l'étude particulière du pouvoir stéatogène du phosphore blanc et aux conditions toxicologiques déterminant son apparition.

Mais avant de poursuivre, il nous paraît nécessaire de procéder, dans une deuxième partie, à un rappel sur les conceptions actuelles ayant trait au métabolisme des lipides, notamment au niveau du foie, afin de mieux concevoir les mécanismes possibles de la stéatose hépatique.

DEUXIEME PARTIE

DONNEES GENERALES SUR LE METABOLISME LIPIDIQUE

ROLE DU FOIE - LES MECANISMES DE LA STEATOSE

- Chapitre Premier : Rappel métabolique.
- Chapitre Deuxième : Rôle du foie dans le métabolisme lipidique.
- Chapitre Troisième : Conséquences : les mécanismes possibles de la stéatose hépatique.

CHAPITRE PREMIER

RAPPEL METABOLIQUE

Les lipides de l'organisme ont une double origine : exogène, c'est-à-dire résultant de l'apport alimentaire et dépendant de ce fait des phénomènes de digestion et d'absorption, et endogène, c'est-à-dire biosynthétique.

I- DIGESTION ET ABSORPTION

Les lipides alimentaires sont essentiellement représentés par les triglycérides qui constituent plus de 90p100 des lipides ingérés, soit environ 120g par jour ; c'est donc surtout de ces molécules qu'il sera ici question.

Une fois ingérés, les triglycérides arrivent dans l'estomac où BORGSTROM & coll (46) ont montré qu'ils pouvaient subir une certaine digestion gastrique, mais l'on n'est pas sûr que celle-ci ne résulte pas d'un reflux du contenu intestinal dans l'estomac (98).

Les triglycérides vont ensuite passer dans la lumière intestinale où ils vont se trouver en contact avec la bile et le suc pancréatique ; ce dernier renferme une enzyme, la lipase pancréatique ou stéapsine qui, activée par les sels biliaires, va hydrolyser les triglycérides (Claude BERNARD, 30) en attaquant spécifiquement les liaisons α pour donner un $\alpha\beta$ diglycéride puis un β monoglycéride (277, 339). Le départ de la dernière molécule d'acide gras n'est pas obligatoire car il exige

une isomérisation préalable en α monoglycéride, processus relativement lent n'intéressant que 28p100 de ces β monoglycérides (278). Ainsi, une partie des triglycérides ingérés est hydrolysée complètement en glycérol et acides gras, le restant subissant une hydrolyse partielle pour donner des mono et diglycérides (316) ; il ne subsiste qu'environ 10p100 de triglycérides non attaqués (144).

C'est l'ensemble de ces produits qui va subir l'absorption dont le siège est, chez l'homme, la région proximale de l'intestin (157, 47, 326). Si le glycérol, hydrosoluble, est facilement absorbé, les acides gras et les différents glycérides, faiblement solubles en milieu aqueux, vont nécessiter un mécanisme plus complexe.

Selon FRAZER (158), les sels biliaires formeraient avec les acides gras et les monoglycérides un système émulsionnant les triglycérides, rendant ainsi possible leur absorption ; mais il semble plutôt (210) que celle-ci se fasse sous forme de micelles mixtes entre les constituants lipidiques, les lysolécithines résultant de l'hydrolyse des lecithines par une lecithinase A pancréatique (45) et surtout les sels biliaires : à la partie supérieure de l'intestin il s'établirait un équilibre entre lipides en émulsion (triglycérides, diglycérides et acides gras) et lipides micellaires (monoglycérides et acides gras). Ces derniers seraient absorbés, les sels biliaires restant dans la lumière intestinale sous forme de micelles simples à nouveau disponibles pour un nouveau transfert : par suite de l'action continue de la lipase pancréatique, les lipides émulsionnés passeraient sous forme micellaire pour être absorbés et la fonction essentielle des sels biliaires serait donc de transporter les acides gras et les monoglycérides depuis l'émulsion intestinale jusqu'aux cellules de la muqueuse. Une fois l'absorption des constituants lipidiques réalisée par diffusion plutôt que par pinocytose (299, 14) les sels biliaires seront alors absorbés à leur tour à un niveau inférieur

dans l'iléon. Notons enfin que le cholestérol, après estérification par la cholestérol estérase pancréatique ou intestinale, pourrait également intervenir dans la constitution des micelles (115).

Une fois dans la cellule intestinale, les différents produits de l'hydrolyse des lipides vont subir certaines transformations avant d'acquérir la structure définitive sous laquelle ils circuleront dans la lymphe. Tout d'abord les monoglycérides peuvent subir une hydrolyse complète en glycérol et acides gras sous l'action de la lipase intestinale (124) ; mais ce sont surtout des réactions de synthèse qui vont se produire : synthèse ou resynthèse des triglycérides à partir des acides gras alimentaires ou endogènes à longue chaîne réagissant sous forme d'acylcoenzyme A d'une part (354) et d'autre part soit du glycérol (338, 197, 213), soit du L-~~x~~glycérophosphate (96), soit, surtout, des β -monoglycérides grâce aux acylases des microsomes (95, 278, 344). Cette synthèse ne se fait pas au hasard et certains acides gras occupent une position privilégiée (36, 50, 102, 313).

Ce sont ces réactions de synthèse, sur lesquelles nous reviendrons, qui sont responsables de l'apparition de gouttelettes graisseuses observées au microscope (370) notamment au niveau du réticulum endoplasmique, les enzymes intervenant dans cette synthèse étant localisés principalement dans l'ergastoplasme (64). Parallèlement à cette synthèse de triglycérides, il se produit un enrichissement de la particule en lécithines provenant de la réacylation des lysolécithines (351) ; en cholestérol et en protéine analogue à celle des lipoprotéines de densité élevée (54, 325, 203, 327), qui conduit finalement à la formation des particules de chylomicrons qui sont constituées par un noyau formé par des triglycérides, tous les esters du cholestérol et une partie du cholestérol libre, entouré par une enveloppe comprenant les phospholipides (lécithines notamment) une protéine (lipoprotéine), le reste du cholestérol libre

et une petite quantité de triglycérides provenant d'une migration sélective des triglycérides saturés du "noyau" vers l'interface (412).

La dernière étape est le transport des chylomicrons vers le lieu de leur utilisation, qui s'effectue par voie lymphatique (29, 37, 220) d'où ils pourront gagner le sang au niveau de l'embouchure du canal thoracique dans la veine sous clavière gauche. Les acides gras à chaîne courte, par contre, arrivent plus directement au foie par la veine porte sous forme d'acides gras non estérifiés (44, 202, 190) liés à l'albumine (187, 159, 186, 334) ; les acides gras à chaîne moyenne (C 10 et C 12) se trouvent à la fois dans le sang et la lymphe (39). Cette distribution des acides gras entre le sang portal et la lymphe semble être contrôlée par la spécificité des enzymes catalysant la synthèse des triglycérides dans la muqueuse intestinale (65).

II- BIOGENESE DES LIPIDES ENDOGENES

Les lipides endogènes comportent de très nombreux constituants qu'il n'est naturellement pas question de passer en revue. Nous citerons essentiellement les glycérides, les phospholipides, le cholestérol et ses dérivés. Dans ce qui va suivre nous nous contenterons d'envisager en détail ce qui concerne les constituants qui représentent la majeure partie des lipides hépatiques : triglycérides et glycérophospholipides.

Nous ne traiterons pas, par contre, le cholestérol et ses dérivés, bien que cela constitue un chapitre très important et complexe du Métabolisme, car sans vouloir anticiper, nous pouvons déjà dire que cette classe de lipides est peu concernée dans la pathogénèse des stéatoses toxiques.

Nous rappellerons, tout d'abord, l'origine des deux molécules de base principales présentes dans la majorité des lipides, le glycérol et les acides gras.

A- CONSTITUANTS ELEMENTAIRES

1- Glycérol

Le glycérol libre d'origine alimentaire ou lipolytique est directement utilisable par les organes (foie, rein, coeur, muqueuse intestinale) qui possèdent la glycérokinase, enzyme assurant la formation de L- α -glycérophosphate en présence d'ATP (69). Le tissu adipeux, qui ne renferme pas de glycérokinase, utilise un précurseur déjà phosphorylé du glycérol issu de la dégradation du glucose-6-phosphate, notamment la phosphodihydroxyacétone qui sera réduite en L- α -glycérophosphate par l' α -glycérophosphate deshydrogénase à NAD (274) ; dans les cas de déperdition en glucose, la cellule peut synthétiser le glycérol à partir du pyruvate (20, 317).

2- Acides gras

Leur biosynthèse a lieu essentiellement au niveau du foie et, chez le jeune rat, au niveau du tissu adipeux ; par contre la synthèse des acides gras par le tissu adipeux humain est négligeable (358).

Elle peut s'effectuer selon deux grandes voies : l'élongation, dont le siège est mitochondrial, et la condensation localisée dans le cytoplasme.

a- Biosynthèse par élongation

Elle consiste en l'addition répétée d'unités dicarbonées (323) sous forme d'acétylcoenzyme A (236), dans une série de réactions catalysées par les mêmes enzymes que celles intervenant dans l'oxydation des acides gras, mais fonctionnant en sens inverse (263), sauf pour la dernière étape qui nécessite une enzyme additionnelle (247, 248, 355) pour réduire le dérivé $\alpha\beta$ insaturé en composé saturé ; cette enzyme est l'énoylcoenzyme A réductase dont la coenzyme est le NADPH. Le principal acide gras produit par cette voie est l'acide stéarique. La suite des réactions est indiquée dans la figure I. Cette voie est une voie mineure (92) qui interviendrait, plutôt, dans l'élongation d'acides gras préexistants (312, 410).

Il y aurait deux systèmes d'élongation distincts dans la mitochondrie : un pour les acides à chaîne moyenne localisé dans la membrane interne, et l'autre pour les acides gras à chaîne longue dans la membrane externe (100).

Quant au site mitochondrial exact de la synthèse "de novo" des acides gras, les arguments concernant sa nature varient selon les auteurs (403, 214).

b- Biosynthèse par condensation

Beaucoup plus importante est cette seconde voie car elle est bien plus favorable au point de vue thermodynamique. Son siège est la phase soluble (52, 53, 309, 51, 395). Dans cette chaîne anabolique, l'acétylcoenzyme A, en présence de bicarbonate (177), subit une carboxylation pour donner la malonylcoenzyme A (394), réaction catalysée par l'acétylcoenzyme A carboxylase qui est constituée par deux fractions protéiques : l'une, la carboxylase (Ea) compor-

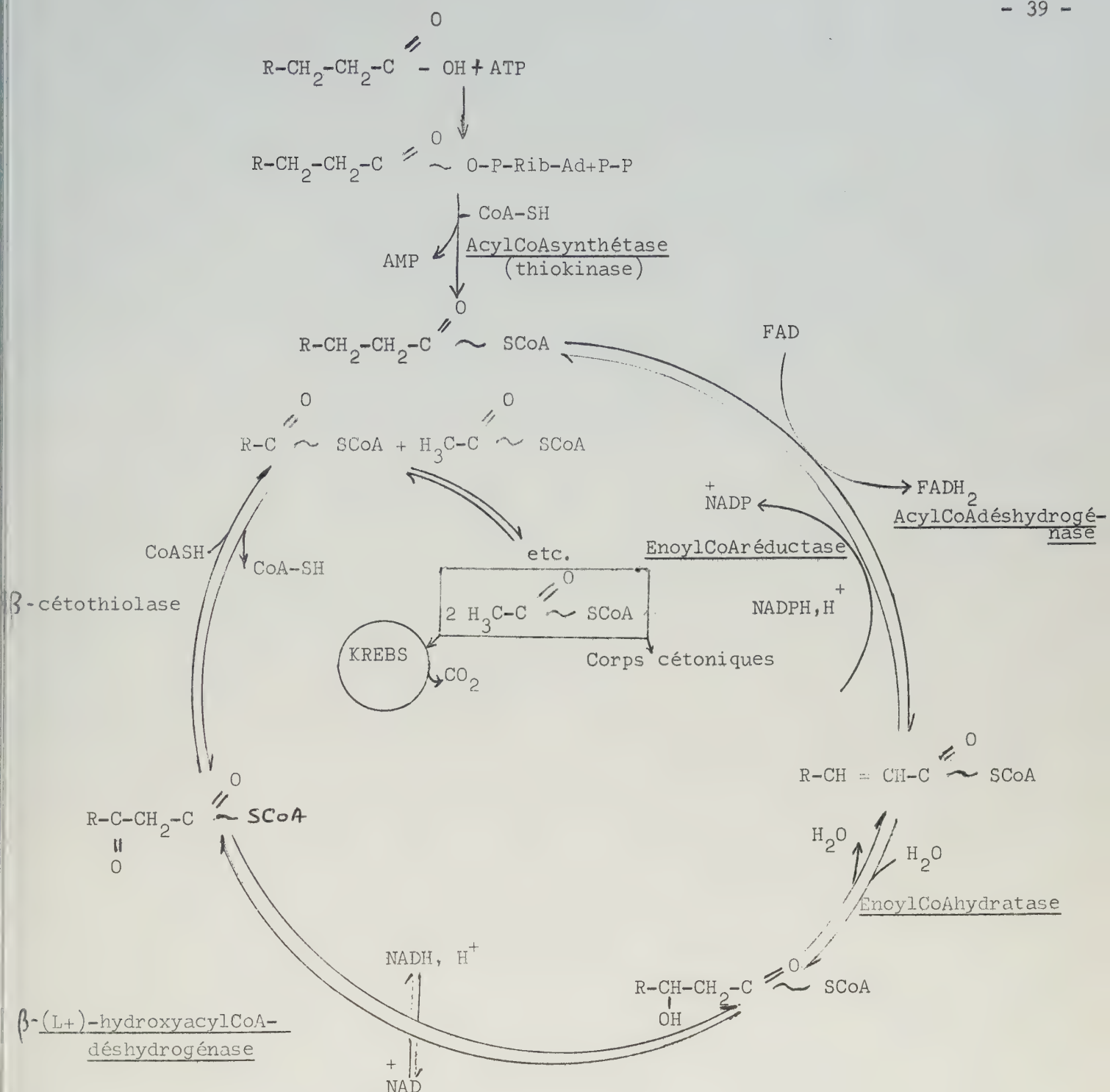
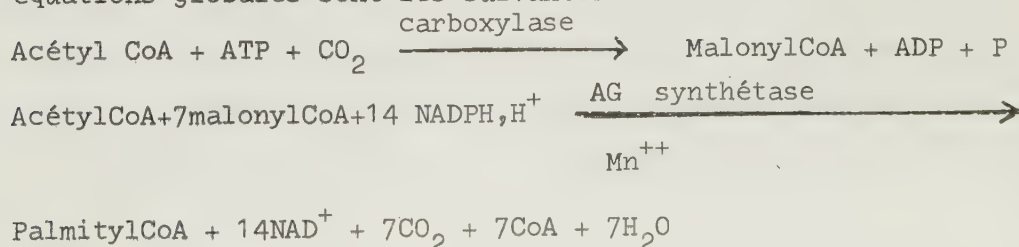


Figure I -

Voies de synthèse et de dégradation des acides gras dans la mitochondrie.

tant la biotine, et l'autre (Eb), la transférase, (8), et dont la forme active est un trimère (383, 294). L'ATP et les ions manganéux, plus actifs que les ions magnésium (350), sont nécessaires à cette synthèse de la malonylcoenzyme A, qui comporte la formation intermédiaire d'un composé d'addition, biotine - enzyme carboxylée dont la structure a été établie (294, 393). Mais pour que cette première réaction puisse se réaliser, il faut que l'acétylcoenzyme A, qui est synthétisée dans les mitochondries, passe dans la phase soluble ; son transfert ne pouvant s'effectuer directement, la membrane mitochondriale étant peu perméable aux molécules liées à la coenzyme A (365), deux mécanismes sont susceptibles d'intervenir : soit un transport sous forme d'acétylcarnitine (55) sur lequel nous reviendrons ultérieurement, soit, surtout, un transport sous forme de citrate (365, 32, 19, 111). Dans ce dernier cas, l'acétylcoenzyme A réagit avec l'oxaloacétate sous l'action de la citrate synthétase pour donner le citrate qui diffuse dans la phase soluble pour redonner, en présence d'ATP, de coenzyme A et d'ions magnésium, de l'acétylcoenzyme A et de l'oxaloacétate, la réaction étant catalysée par l'ATP-citrate lyase (366, 154).

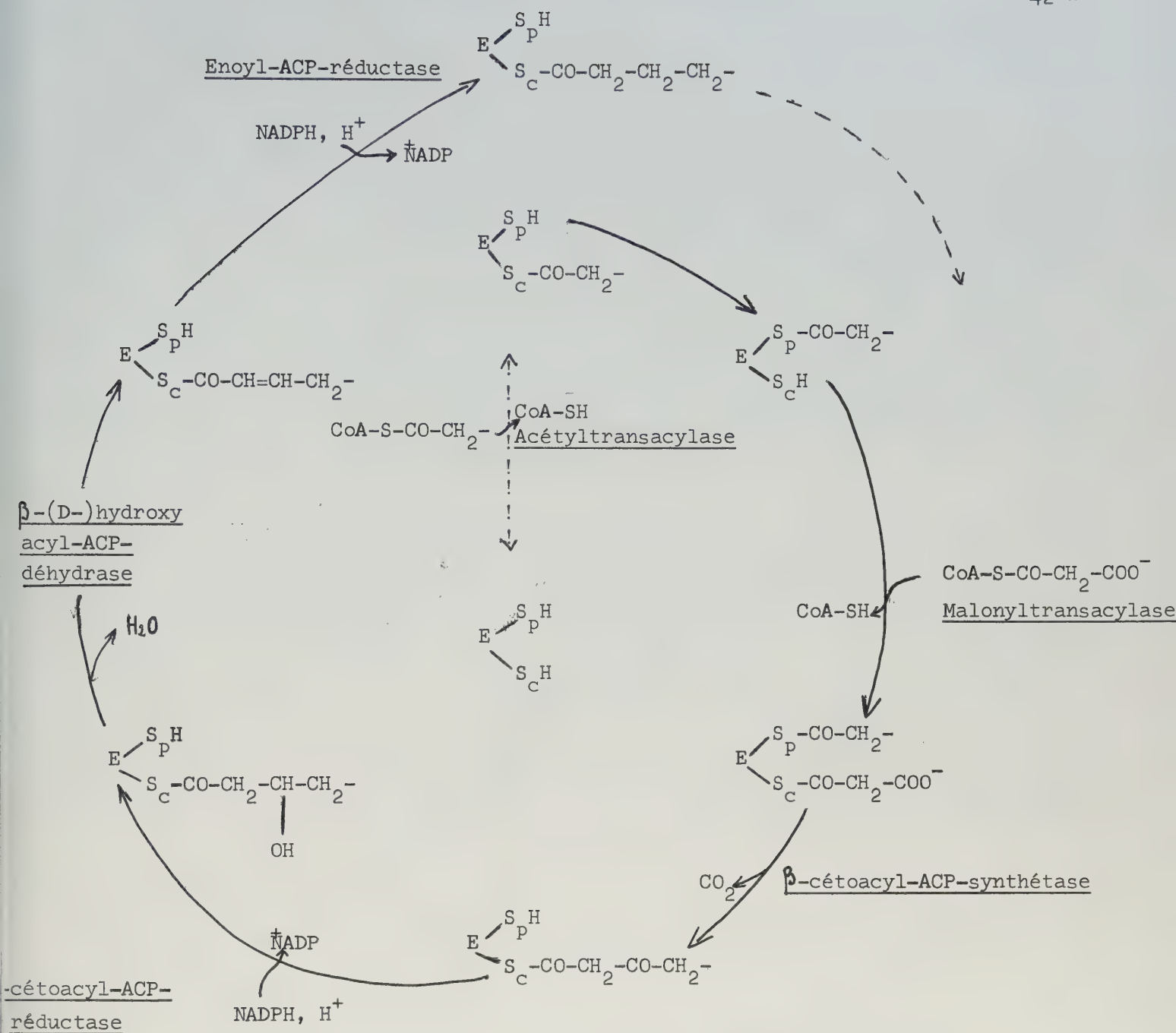
C'est la malonylcoenzyme A qui représente la source des chaîons dicarbonés qui vont être impliqués dans des réactions couplées de condensation-décarboxylation pour conduire finalement aux molécules d'acides gras à longue chaîne. Le principal acide gras produit par cette voie est l'acide palmitique (60, 81). Les équations globales sont les suivantes :



Le NADPH est principalement fourni par la première étape de la glycolyse conduisant à la voie des pentoses, c'est-à-dire l'oxydation du glucose-6-phosphate en acide phospho-6-gluconique par la glucose-6-phosphate déshydrogénase dont la coenzyme est le NADP (Glucose-6-P + NADP^+ $\xrightarrow{\text{G6PD}}$ Acide P-6-gluconique + NADPH, H^+). Il est par contre peu probable que l'enzyme malique qui catalyse la décarboxylation oxydante de l'acide malique en acide pyruvique (Malate + NADP^+ $\xrightarrow{\text{enzyme malique}}$ Pyruvate + NADPH, H^+) soit impliquée comme source du NADPH nécessaire à la lipogénèse (397, 302).

La séquence des différentes réactions, prévue par LYNEN dès 1961 (264) et démontrée notamment par MAJERUS & coll. (271) et WAKIL & coll. (396) en 1964, est indiquée dans la figure II. La flavine est nécessaire à la deuxième réduction chez la levure (264) mais non chez le pigeon (215).

Il faut noter que les différents substrats intermédiaires ne sont pas libres mais engagés dans des liaisons thioesters avec une protéine thermo et acidostable, la protéine acyl - vectrice ou ACP ("Acyl Carrier Protein") (185, 184, 182). Son groupement prosthétique est un élément que l'on retrouve aussi dans la coenzymeA, la 4'-phosphopanthotéine (272, 311) qui est liée à l'apo-ACP par la sérine (384). L' ACP fait partie intégrante de l'acide gras synthétase, système multienzymatique contenant en fait les sept enzymes intervenant aux différentes étapes de la biosynthèse des acides gras, soit sous forme de complexe chez la levure (264, 400, 407), le rat (7, 249) et le pigeon (215, 409), soit sous forme d'enzymes solubles dissociées chez Escherichia Coli (183). La 4'-phosphopanthotéine forme un véritable bras flexible de 20Å portant à son extrémité le groupement thiol central (" $\text{S}_\text{C}\text{H}$ ")



Réaction finale (BARNES & WAKIL, 23) :

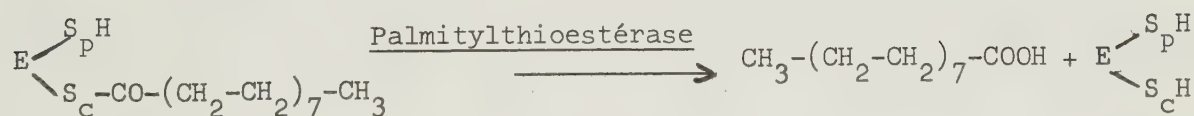
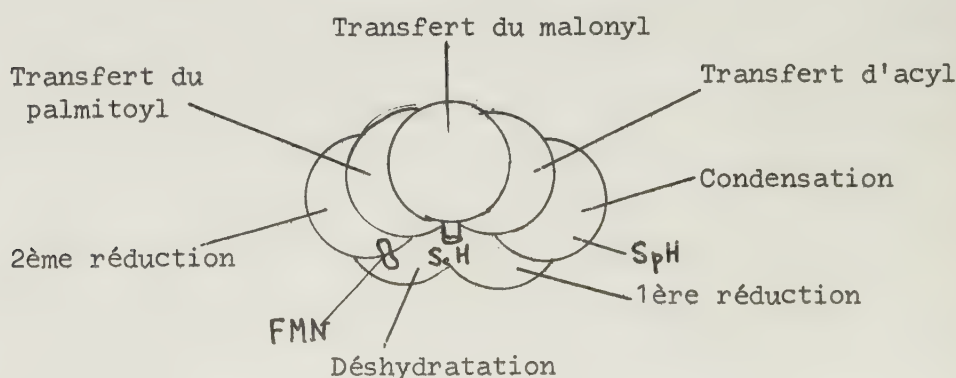


Figure II.- Biosynthèse des acides gras par condensation.

de l'enzyme auquel vont se fixer les différents intermédiaires de la synthèse des acides gras, qui pourront ainsi être aisément mis en contact étroit avec le site actif de chaque enzyme constitutive du complexe (265, 372, 231). Le site accepteur initial des restes acétyl et malonyl est constitué par le groupement hydroxyle de la sérine (265, 231). Ces deux restes seront ensuite successivement transférés sur le groupement -SH central.

Le groupement thiol périphérique ($-S_pH$), sur lequel migre le reste acétyl pour permettre la fixation du reste malonyl par le -SH central, est localisé au niveau de l'enzyme de condensation du complexe (265, 231). Ce groupement thiol périphérique est donc spécifique du reste acétyl et la synthèse s'arrêterait au stade du palmitate parce que celui-ci resterait préférentiellement sur le groupement -SH central, plus lipophile, bloquant ainsi la captation d'un nouveau reste malonyl jusqu'à ce que l'acide gras soit libéré du complexe enzymatique par transfert sur la coenzyme A.

La figure III permet de rendre compte des différentes étapes de cette synthèse (p. 44).



Structure hypothétique du complexe multienzymatique de l'acide gras synthétase de la levure (LYNEN, 265).

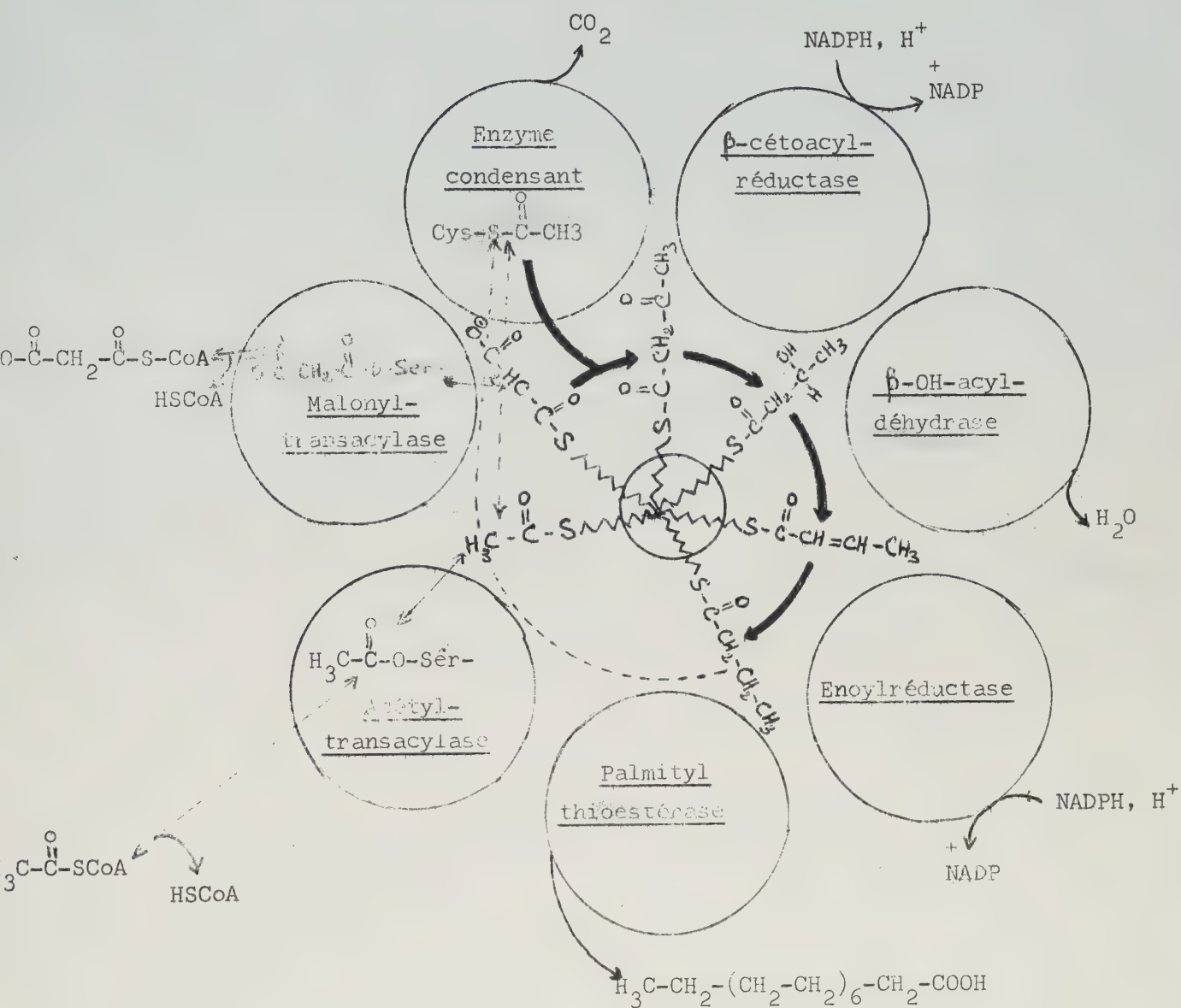


Figure III -

Synthèse des acides gras par le complexe multienzymatique du pigeon.

Finalement, les atomes de carbone ω et $\omega-1$ sont fournis par l'acétyl Coenzyme A, les autres dérivant de la malonyl Coenzyme A (382).

Les acides gras insaturés (acides oléique, γ -linoléique) sont formés par des désaturases à pyridine nucléotides dont la synthèse dépend de l'insuline (171, 172, 280). La réaction nécessite l'intervention de la coenzyme A, de l'ATP et d'oxygène moléculaire (40). Le NADH est plus actif que le NADPH (298, 230).

La désaturase des microsomes semble être constituée par trois composés différents (212): la NADH cytochrome b_5 réductase, le cytochrome b_5 et la "désaturase" qui comprend vraisemblablement un facteur cyano-sensible (298).

Il nous faut noter que le facteur limitant de la synthèse des acides gras est constitué par l'acétyl Coenzyme A carboxylase ; elle est l'objet d'une inhibition rétrograde ("Feed-back inhibition") de la part de l'acyl Coenzyme A à longue chaîne formée (49, 294, 133, 262).

Il nous faut signaler enfin qu'il existe un troisième site pour la synthèse des acides gras associé aux microsomes (293, 193), qui nécessite de la malonyl Coenzyme A, du NADPH et des ions magnésium. En l'absence d'ATP, ce système réalise la synthèse "de novo" des acides gras ; en présence d'ATP, c'est l'élongation des acides gras endogènes qui prédomine et le NADH peut remplacer le NADPH (245).

B- BIOGENESE DES TRIGLYCERIDES ET DES GLYCEROPHOSPHOLIPIDES

C'est donc à partir du L- α -glycérophosphate et des acides gras que vont être synthétisées ces deux classes de lipides. Signalons dès maintenant, que si les acides gras réagissent généralement sous forme d'acylCoenzyme A, ils peuvent également participer à ces synthèses à l'état de thioesters de l'ACP (3, 180, 4, 181), au moins chez les bactéries.

1- Triglycérides (fig. IV)

Si la lipogénèse est beaucoup plus active dans le tissu adipeux qu'elle ne l'est dans le foie, c'est au niveau de ce dernier qu'est synthétisée la quasi totalité des triglycérides endogènes circulants. Cette synthèse, comparable dans les deux organes, est réalisée dans les microsomes (368, 405) à partir du L- α -glycérophosphate et des acides gras endogènes ou circulants réagissant sous forme de thioesters de la Coenzyme A. Les lysolécithines membranaires participeraient au transfert des acides gras circulants à travers la membrane (318).

Tout d'abord le L- α -glycérophosphate est estérifié par deux molécules d'acylCoenzyme A dont une est généralement saturée ; l'acide L- α -phosphatidique formé est ensuite hydrolysé pour donner un diglycéride (363) qui sera enfin estérifié par une troisième molécule d'acylcoenzyme A (399), ce qui conduit à la molécule de triglycéride qui sera incorporée dans les différentes molécules de lipoprotéines (198). Les données relatives à ces lipoprotéines seront envisagées dans le deuxième chapitre.

2- Glycérophospholipides

Leur synthèse est, dans sa phase initiale, parallèle à celle des triglycérides, mais les bases azotées sont incorporées sous forme de nucléotides (233). Le détail des réactions est indiqué dans la figure IV. Quant au site de cette synthèse, on a pensé pendant longtemps, que seuls les microsomes pouvaient synthétiser ces molécules (405) ; cependant, il semble bien que les mitochondries en soient capables (109, 337), essentiellement au niveau de leur membrane externe (74). Les lécithines peuvent également provenir de l'acylation (246) ou de la transacylation des lysolécithines (385).

Les phosphatidyléthanolamines peuvent résulter, en outre, de la décarboxylation des phosphatidylsérines et conduire, par des méthylations progressives en présence de la S-adénosylméthionine, aux phosphatidylcholines (56, 57, 178, 34).

III- CATABOLISME DES LIPIDES

A- TRIGLYCERIDES

Les triglycérides sanguins, qui circulent sous forme de lipoprotéines (triglycérides endogènes) ou de chylomicrons (triglycérides exogènes), vont être rapidement retirés de la circulation par trois organes essentiellement : foie, tissus périphériques (musculaire notamment) et tissu adipeux.

Au niveau du foie, il semble que la molécule soit captée, intacte, dans les espaces extracellulaires de DISSE (27). Il faut noter (346) que les triglycérides des lipoprotéines disparaissent plus rapidement de la circulation que ceux du chyle. Ils sont ensuite hydrolysés. Chez

le rat il existerait trois lipases différentes (194) :

- une lipase acide, lysosomiale, qui hydrolyserait les triglycérides endogènes à chaîne longue,
- une lipase membranaire, sensiblement neutre, héparino-sensible qui serait responsable de la dégradation des triglycérides pénétrant dans la cellule,
- une lipase microsomiale, alcaline, qui est plus active sur les triglycérides à chaîne courte

Une partie des acides gras libérés (moins de 20p100) et, à un degré moindre, du glycérol vont pouvoir resynthétiser des lipides hépatiques ; une autre partie des acides gras subit une oxydation et le glycérol, quant à lui, est surtout intégré dans le métabolisme glucidique.

Au niveau des muscles et du tissu adipeux, par contre, les triglycérides des chylomicrons et des lipoprotéines doivent subir une hydrolyse extracellulaire par une enzyme, la lipoprotéine lipase (239, 240, 89, 35), dont un des cofacteurs principaux est l'héparine. Cette hydrolyse se produirait sur la paroi même de l'endothélium des capillaires. Les acides gras libérés sont soit oxydés (voie très importante dans les muscles, notamment le myocarde, mais mineure dans le tissu adipeux), soit utilisés pour la resynthèse des triglycérides, notamment au niveau du tissu adipeux où ils vont rejoindre les triglycérides endogènes synthétisés "de novo" dans l'adipocyte.

Les triglycérides de réserve ainsi constitués pourront alors subir l'action d'au moins deux lipases : (différentes de la lipoprotéine lipase) :

- une lipase hormonosensible (321) agissant sur les liaisons esters α et α' des triglycérides et qui doit être activée par l'AMP cyclique

- (322), nucléotide formé à partir de l'ATP par l'adénylcyclase (373) mais qui peut être inactivé par une phosphodiesterase spécifique (73);
- une monoglycéride lipase qui serait spécifique des β -monoglycérides (388).

Le glycérol libre n'est pas réutilisable pour la synthèse des triglycérides de réserve et est libéré dans la circulation ; son dosage permet d'apprécier avec exactitude l'intensité de la lipolyse (356, 82).

Le tissu adipeux est donc un tissu d'une extrême activité qui peut être orientée par de nombreuses substances (101) :

- les unes, "lipolytiques" : catécholamines, glucagon, ACTH, STH, TSH qui stimulent l'activité de l'adénylcyclase et, par conséquent, la libération d'acides gras non estérifiés et de glycérol dans la circulation,
- les autres, "antilipolytiques" : prostaglandines et insuline qui inhibent l'adénylcyclase ; l'action de l'insuline est complexe et est renforcée par la présence de glucose (qui sert de précurseur de l' α -glycérophosphate) dont elle facilite le transport à travers la membrane cellulaire.

B- PHOSPHOLIPIDES

Le catabolisme des phospholipides a lieu surtout au niveau du foie. Une partie est simplement excrétée dans la bile (229). Le reste est dégradé sous l'action des différentes phospholipases : les phospholipases A_1 des microsomes et A_2 des mitochondries (392) hydrolysant les phospholipides exogènes mais non endogènes (343) en lysodérivés

qui, sous l'action de phospholipase B de la phase soluble (lyso-phospholipase), conduisent notamment à la glycérophosphorylcholine et à la glycérophosphoryléthanolamine. Ces dernières, sous l'action d'une diestérase, libéreront la base azotée et le glycérophosphate. La choline, par oxydation, conduira à la bêtaïne. Une lécithinase spécifique de la position α' des lécithines est présente dans le plasma post-héparine (390). Enfin, une lécithine-cholestérol-acyl-transférase attaque les liaisons β (179) ; cette enzyme serait responsable de la formation des esters du cholestérol dans le sérum humain.

C- ACIDES GRAS

Les acides gras libérés lors des différentes réactions que nous venons de rappeler peuvent être soit réutilisés pour la synthèse de nouvelles molécules de lipides complexes, comme dans le cas du tissu adipeux, soit oxydés ce qui est réalisé surtout dans le foie et le muscle, (notamment le myocarde) selon le schéma classique de la β oxydation de KNOOP (237) dont le siège est la membrane interne de la mitochondrie (232).

La réaction initiale est l'activation de l'acide gras par la coenzyme A (241) en présence d'acylcoenzyme A synthétase au niveau des microsomes et de la membrane mitochondriale externe (161, 301). Le transfert de l'acylcoenzyme A vers le site d'oxydation intramitochondrial nécessite l'intervention de la carnitine (164, 55, 165) qui va donner sous l'action de la carnitine acylcoenzyme A transférase présente dans les microsomes et les mitochondries (292, 387), une acylcarnitine de poids moléculaire inférieure, plus hydrosoluble que l'acylcoenzyme A, qui franchira alors la membrane mitochondriale in-

terne et redonnera, en présence de coenzyme A, l'acylcoenzyme A (Figure V, 381). Ce dernier va subir la séquence des réactions de la β -oxydation (Figure I) pour donner, selon qu'il a un nombre d'atomes de carbone pair ou impair de l'acétyl ou de la propionyl coenzyme A, cette dernière étant ensuite transformée en succinyl-coenzyme A (149, 26).

La combinaison du mouvement circulaire de la séquence périodique de réactions de même type et du mouvement rectiligne uniforme de la dégradation régulière de la chaîne polyméthylénique évoque le mouvement hélicoïdal d'où le nom d'hélice de LYNEN (263) donné à ce processus.

Acétyl et succinyl coenzyme A seront ultérieurement brûlés à travers le cycle de KREBS, une fraction de l'acétylcoenzyme A, variable selon les conditions métaboliques, peut conduire aux corps cétoniques.

Le bilan énergétique de la β -oxydation est largement positif puisque cinq molécules d'ATP sont formées à l'occasion de chaque tour de spire.

Il faut noter d'autre part que la carnitine augmente la vitesse d'incorporation de la palmitylcoenzyme A dans les phospholipides mitochondriaux, notamment les lécithines (59).

Outre la β -oxydation, deux autres types d'oxydation peuvent intervenir, au niveau des microsomes : l' α -oxydation (369, 255, 267) et l' ω -oxydation (113, 260).

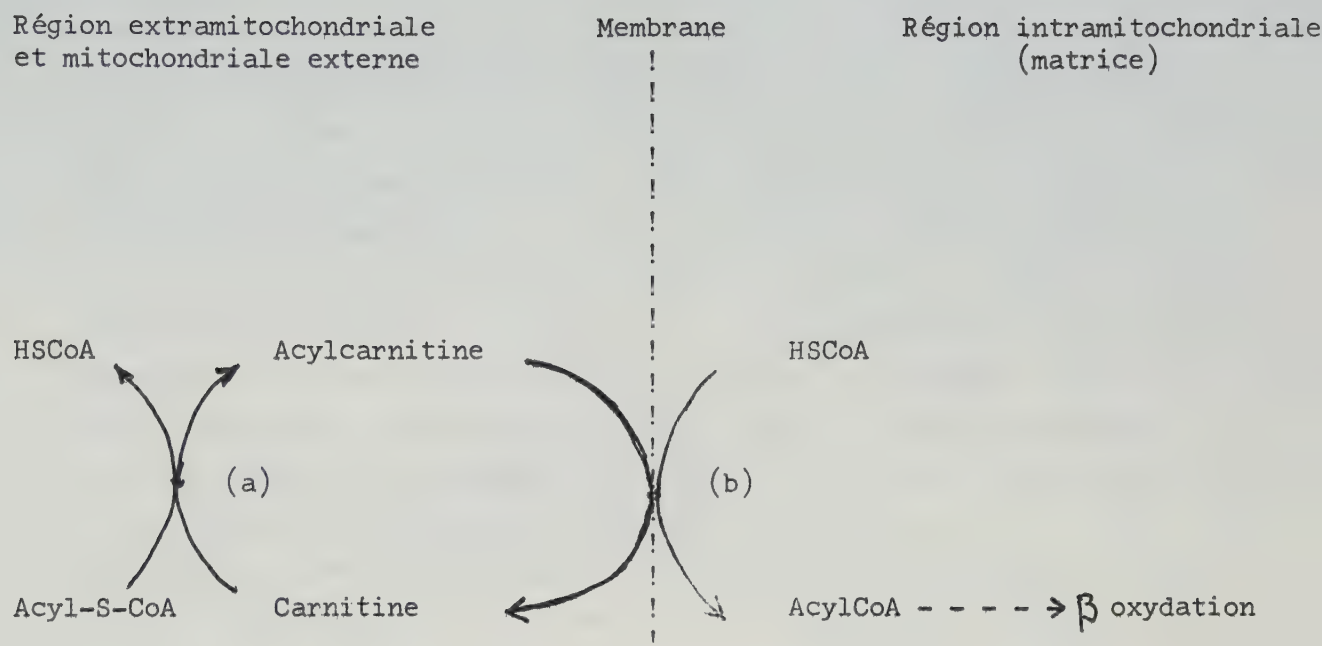


Figure V. - Translocation carnitine-dépendante des acyl-CoA

(a) et (b) : site de la carnitine acyltransférase.

CHAPITRE DEUXIEME

ROLE DU FOIE DANS LE METABOLISME LIPIDIQUE

1 - Le foie intervient de façon décisive dans l'anabolisme des lipides. Cet organe constitue, en effet, en dehors des périodes d'absorption, quand aucun triglycéride exogène n'est ingéré, la principale source des triglycérides plasmatiques dont les précurseurs varient, notamment, selon l'espèce et l'état nutritionnel. C'est ainsi que chez l'homme, le principal précurseur immédiat des acides gras des triglycérides plasmatiques est représenté par les acides gras non estérifiés plasmatiques (204, 162, 137) que le foie capte quelle que soit leur origine ; l'autre précurseur, le glycérol, peut être phosphorylé au niveau de cet organe qui possède ainsi tout le potentiel biosynthétique nécessaire. Chez le rat, par contre, une fraction plus petite (environ un tiers) provient de ce "pool", la source la plus importante quantitativement étant la lipogénèse hépatique et les phospholipides (17, 18, 291).

Les triglycérides sont répartis en deux "pools" (368, 48, 205, 17) :

- un "pool" à renouvellement lent qui est constitué par des triglycérides libres, représentant la "graisse flottante" après centrifugation d'un homogénat tissulaire ;
- un "pool" à renouvellement extrêmement rapide correspondant aux triglycérides de la phase soluble et des membranes cytoplasmiques ; c'est sans doute cette fraction des triglycérides qui se retrouve dans le plasma sous forme de β -lipoprotéines (218).

Le foie est également un lieu de synthèse active d'autres classes de lipides ; phospholipides et cholestérol.

2 - Le caractère hydrophobe des lipides nécessite la formation de complexes lipido-protéiques essentiels au transport de ceux-ci. C'est également le foie qui va élaborer la copule protéique de ces différentes lipoprotéines qui vont ainsi constituer les formes circulantes des lipides. Ces molécules sont classées généralement en fonction de leur constante de flottation en ultracentrifugation, leur richesse en lipides étant inversement proportionnelle à la densité. On distingue, essentiellement, quatre groupes principaux de lipoprotéines (348) :

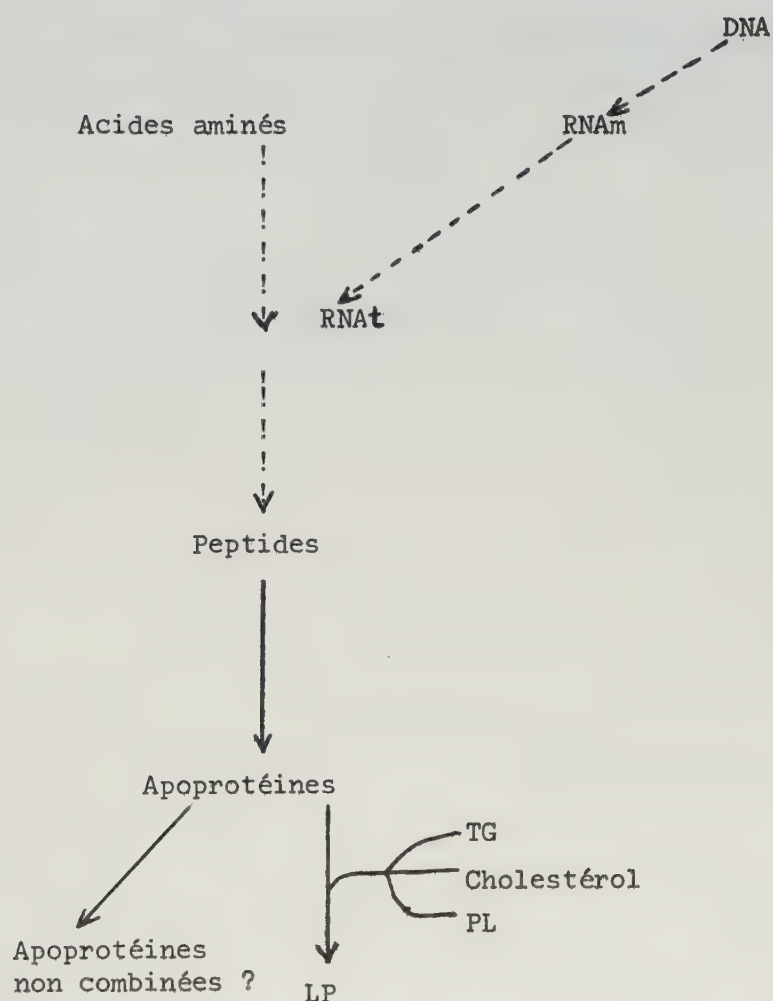
- les chylomicrons ($d < 0,95$), dont nous avons déjà parlé ;
- les lipoprotéines de très basse densité, ou VLDL ($0,95 < d < 1,006$), également appelées β -lipoprotéines légères, contenant environ 50p100 de triglycérides, 22p100 de cholestérol, 18p100 de phospholipides et 10p100 de protéines ;
- les lipoprotéines de basse densité ou LDL ($1,006 < d < 1,063$) encore appelées β -lipoprotéines lourdes, contenant environ 10p100 de triglycérides, 47p100 de cholestérol, 23p100 de phospholipides et 20p100 de protéines ;
- les lipoprotéines de haute densité ou HDL ($1,063 < d < 1,21$) qui renferment environ 5p100 de triglycérides, 20p100 de cholestérol, 27p100 de phospholipides et 48p100 de protéines.

Leur structure et leur formation ont donné lieu à des travaux considérables (348). Sur le plan structural on imagine que les lipoprotéines possèdent une structure globulaire avec une enveloppe de protéine associée à des complexes phospholipides-cholestérol, dont le pôle hydrophile est orienté vers l'extérieur et le pôle hydrophobe vers un "noyau" de triglycérides et d'esters du cholestérol. Ces données paraissent corroborées par les observations en microscopie électronique qui ont mis en évidence, cependant, une forme différente des lipoprotéines légères (VLDL et LDL) et les lipoprotéines lourdes (HDL) (348).

Il faut noter d'autre part que l'apoprotéine des lipoprotéines est constituée par l'association de plusieurs polypeptides (342, 357, 341), dont deux sont communs aux HDL et aux VLDL (357). Ceci permet d'expliquer,

en partie, les liens structuraux et métabolique extrêmement complexes, dont l'étude ne fait que débiter, entre ces deux classes de lipoprotéines.

Au point de vue de la formation des lipoprotéines, on peut imaginer la filiation suivante :



On voit donc les relations particulièrement étroites qui existent entre les deux métabolismes protéique et lipidique, dont la conjonction permet aux lipides synthétisés au niveau hépatique d'être transportables vers leurs lieux d'utilisation.

3 - Enfin, le foie catabolise ces différentes molécules de lipides pour former du glycérol et des acides gras lesquels, par oxydation, libéreront de l'anhydride carbonique ou donneront naissance à des corps cétoniques. Cette dernière voie devient importante pendant les périodes de jeûne prolongé ou dans les cas de mauvaise utilisation du glucose.

Devant la multiplicité et l'importance des rôles du foie dans le métabolisme lipidique, il n'est pas surprenant que l'une des manifestations de l'atteinte de cet organe consiste en une accumulation de lipides à son niveau, c'est-à-dire la stéatose.

CHAPITRE TROISIEME

CONSEQUENCES:

LES MECANISMES POSSIBLES DE LA STEATOSE HEPATIQUE

En fonction du rôle du foie dans le métabolisme lipidique, quatre hypothèses très générales peuvent être envisagées comme mécanisme possible de la stéatose hépatique toxique (254, 331, 256, 99) :

1- Augmentation de la synthèse hépatique des triglycérides

Nous avons déjà insisté sur le fait que le foie possédait tout le potentiel nécessaire pour réaliser la synthèse "de novo" des triglycérides ; aussi, la première hypothèse qui vient à l'esprit pour expliquer la stéatose est une augmentation de la vitesse de formation de ces molécules, qui deviendrait supérieure à leur utilisation. Pour que cette augmentation puisse se produire, il faut que la synthèse des deux substrats, acides gras et glycérol, soit augmentée.

2- Diminution de la dégradation hépatique des triglycérides

L'exploration d'une telle éventualité nécessite des études "in vitro" dont l'extrapolation des résultats à l'organisme entier est extrêmement délicate voire très discutable. Encore faudrait-il que ce mécanisme puisse avoir une réelle importance "in vivo", car la dégradation hépatique des triglycérides constitue déjà une voie mineure d'utilisation de ces molécules.

3- Augmentation de la mobilisation des acides gras

Le tissu adipeux constitue la grande réserve de triglycérides de l'organisme et de nombreuses substances dites "lipolytiques" sont susceptibles d'activer l'hydrolyse de ces molécules, donc la libération dans le plasma d'acides gras non estérifiés et de glycérol. Ceux-ci peuvent alors

être captés par le foie et permettre la synthèse de nouvelles molécules de triglycérides à condition que leur taux de captation hépatique soit augmenté. Nous devons indiquer que cette troisième hypothèse n'a pas été, à notre connaissance, étudiée dans le cas du phosphore blanc.

4- Diminution de l'utilisation des triglycérides hépatiques

Chez le rat, espèce la plus fréquemment utilisée pour l'étude expérimentale de la stéatose, la principale voie d'utilisation des triglycérides hépatiques est leur sécrétion dans le plasma sous forme de lipoprotéines (17). Dans les cas de défaut de synthèse ou de sécrétion de ces molécules, le transport des triglycérides vers les tissus extra hépatiques, de même que leur concentration plasmatique, vont être diminués et conduire à leur accumulation dans le foie. LOMBARDI & RECKNAGEL (258) ont déjà observé que le phosphore blanc provoquait une chute des triglycérides sériques et empêchait l'apparition de l'hypertriglycéridémie consécutive à l'injection intraveineuse de Triton qui, normalement, bloque la sortie des triglycérides du compartiment plasmatique.

Cette diminution de la capacité du foie à libérer les triglycérides dans le sang circulant peut être la conséquence d'une action du toxique sur une des étapes de la synthèse des lipoprotéines (voir schéma page 56). SEAKINS & ROBINSON (352) ont trouvé que le phosphore blanc provoquait une diminution de l'incorporation de la DL-leucine dans les protéines du foie, qui est accompagnée d'une diminution, moins marquée, de l'incorporation de cet acide aminé dans les lipoprotéines sériques. Par contre, aucune étude du renouvellement de la partie lipidique de ces molécules n'a été faite.

Ainsi donc, la stéatose hépatique peut être théoriquement expliquée à la lumière de l'une de ces quatre hypothèses générales. Cependant, il ne faut pas écarter la possibilité de l'intervention de plusieurs mécanismes différents.

Nous reviendrons au cours de leur analyse sur la discussion plus détaillée des différents processus pouvant expliquer la pathogénèse de la stéatose phosphorée ainsi que sur les travaux qu'elle a suscités.

*

*

*

En conclusion de cette deuxième partie, il nous faut insister sur le fait que dans un domaine aussi complexe que la stéatose, qui voit l'intrication des différents métabolismes : glucidique, protéique et naturellement lipidique, les connaissances sont en constante évolution. Ceci entraîne une double conséquence :

- la difficulté de l'étude d'un tel phénomène est certaine,
- la prudence dans la formulation de toute hypothèse concernant son mécanisme de formation sera nécessaire.

Mais avant d'aborder la partie expérimentale de ce travail, il est nécessaire de décrire le matériel et les méthodes que nous avons utilisés.

TROISIEME PARTIE

MATERIEL ET METHODES

- Chapitre Premier : Matériel biologique.

- Chapitre Second : Techniques utilisées.

CHAPITRE PREMIER

MATERIEL BIOLOGIQUE

I- MATERIEL ANIMAL

Tous les animaux utilisés au cours de ce travail sont des rats mâles de souche WISTAR, âgés de quatre à six mois, pesant entre 300 et 450 grammes, et dont la sensibilité au toxique nous est apparue plus constante que celle de l'animal plus jeune. Les animaux ont été répartis en lots homogènes en fonction de leur courbe de croissance et de leur poids (110), nourris de façon identique ("aliment composé complet entretien U.A.R. pour rats et souris" contenant en particulier 13p100 d'eau, 15p100 de protéines, 2,3p100 de lipides, 4,75p100 de cellulose, 6,1p100 de sels minéraux et les vitamines A, D3, E et B) et maintenus à une température de $+ 23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

II- FORME D'ADMINISTRATION DU PHOSPHORE BLANC

Le phosphore blanc est administré en solution dans l'huile d'olive neutralisée et stérilisée. La manipulation de cet élément étant dangereuse, il est nécessaire de procéder tout d'abord à une pesée approximative du toxique sous eau, puis à la pesée précise finale, sous huile, de la quantité à dissoudre. On transvase ensuite cette préparation dans un ballon jaugé que l'on remplit aux neuf dixièmes d'huile et chauffe progressivement jusqu'à $+ 80^{\circ}\text{C}$; pendant cette opération il faut déboucher trois fois le ballon, puis bien fermer et agiter énergiquement jusqu'à dissolution complète. Après refroidissement on complète au volume final.

La concentration de la solution que nous utilisons est généralement de 1p100. Cette solution est préparée extemporanément et conservée à $+4^{\circ}\text{C}$

jusqu'au moment de son administration. Celle-ci est réalisée, après réchauffement, par la voie sous-cutanée au niveau de la région abdominale ; nous reviendrons sur le choix de cette voie au cours de la discussion des essais de tolérance initiale que nous avons effectués.

III- PREPARATION DE LA PULPE HEPATIQUE

Au terme de l'expérimentation, les animaux sont pesés puis assommés et décapités ; le sang est recueilli et les foies sont immédiatement prélevés et placés dans un bécher contenant une solution de saccharose 0,25M maintenue à +4°C ; les foies sont débarrassés du sang par lavage avec la solution de saccharose froide, puis essorés superficiellement sur papier JOSEPH et pesés aussitôt. Ils sont ensuite coupés en morceaux que l'on lave et essore comme précédemment, puis broye à la presse FISHER. C'est sur la pulpe ainsi obtenue que seront effectués, après homogénéisation dans un milieu approprié, la détermination des activités enzymatiques, des protéines totales, ainsi que l'extraction et le dosage des lipides et des différentes fractions lipidiques hépatiques.

CHAPITRE SECOND

TECHNIQUES UTILISEES

I- DETERMINATION DES ACTIVITES ENZYMATIQUES HEPATIQUES

Nous avons étudié l'activité de cinq enzymes cytoplasmiques ou à prédominance cytoplasmique hépatiques :

a- Trois enzymes glycolytiques :

- une enzyme de la voie des pentoses la glucose-6-phosphate déshydrogénase qui intervient dans la première étape de la dégradation oxydative du glucose-6-phosphate et qui assure la formation de la quasi totalité du NADPH nécessaire à la lipogénèse,
- deux enzymes de la voie d'EMBDEN-MEYERHOF : la fructose-1-6-diphosphate aldolase qui catalyse la formation des trioses-phosphate pouvant servir de précurseurs du glycérol lipidique, et la lacticodéshydrogénase qui catalyse la réduction du pyruvate en lactate.

b- Une enzyme la malicodéshydrogénase (MDH), différente de la MDH mitochondriale (117, 93), catalysant la même réaction que la MDH mitochondriale du cycle de Krebs, à savoir la réduction en malate de l'oxaloacétate issu du clivage du citrate sous l'action de l'ATP-citrate lyase.

c- Enfin une enzyme intervenant dans le métabolisme protidique, plus particulièrement au niveau des acides aminés, dont l'activité est spécialement élevée dans le foie par rapport aux autres organes : la transaminase glutamique-pyruvique.

Les techniques mises en oeuvre pour la détermination de l'activité de chacune de ces enzymes sont les techniques par spectrophotométrie dans l'ultra-violet préconisées par BERGMEYER (28), en utilisant les réactifs

des "Biochemica Test Combinations" BOEHRINGER (376). Les mesures sont réalisées sur une partie aliquote de la pulpe hépatique qui, après pesée, est homogénéisée à l'aide de l'appareil de THOMAS avec dix parties de solution de saccharose 0,25M à +4°C pendant cinq minutes.

Les homogénats à 10p100 ainsi obtenus sont ensuite centrifugés pendant trente minutes à 4000t/mn et à +4°C ; la pellicule lipidique surnageante est éliminée et l'on recueille la couche cytoplasmique intermédiaire sur laquelle vont pouvoir être alors déterminées les différentes activités enzymatiques hépatiques précitées.

Dans tous les cas, la vitesse de la réaction est appréciée par la réduction ou l'oxydation d'une coenzyme pyridine-dinucléotidique (NAD ou NADP) que l'on suit en mesurant la densité optique à la longueur d'onde pour laquelle la forme réduite de la coenzyme présente un maximum d'absorption soit 340nm ; toutes les mesures sont effectuées dans des cuves en quartz au spectrophotomètre enregistreur "LERES" type "SPILA".

Les résultats sont exprimés en unités internationales par gramme de protéines (UI/g) , une unité internationale représentant la quantité d'enzyme qui transforme une micromole de substrat en une minute à + 25°C. Le calcul est donc effectué d'après la formule suivante :

activité enzymatique hépatique en UI/g =

$$\frac{\Delta E}{6,22} \times \frac{V}{PE} \times \frac{1}{p} \times \frac{1000}{p} \times d$$

dans laquelle:

ΔE = variation de la densité optique par minute,

V = volume du mélange réactionnel dans la cuve de mesure (ml),

PE = prise d'essai de l'homogénat à 10p100 exprimée en ml,

p = mg de protéines par ml d'homogénat à 10p100,

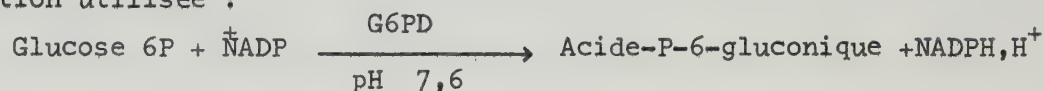
d = dilution éventuelle de l'homogénat à 10p100.

Le coefficient d'extinction moléculaire du NADH et du NADPH est $6,22 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{mole}$ à 340 nm.

Pour chaque enzyme étudiée, nous ne rappellerons que la ou les réactions sur laquelle est basé le principe de la détermination, le sens de la variation de la densité optique et la prise d'essai de l'homogénat à 10p100 ou de son éventuelle dilution.

1- Glucose-6-phosphate déshydrogénase

- Réaction utilisée :

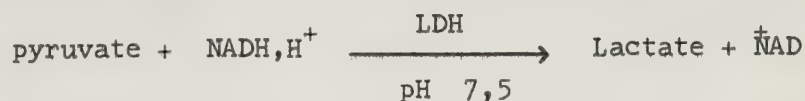


On suit donc l'augmentation de la densité optique.

- Prise d'essai : 0,10ml de l'homogénat à 10p100 (d=1).

2- Lacticodéshydrogénase

- Réaction utilisée :

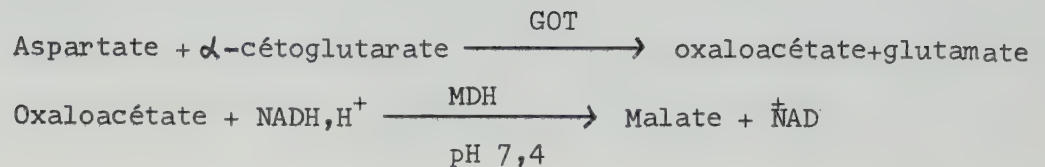


On suit donc la diminution de la densité optique.

- Prise d'essai : 0,10ml d'une dilution au centième de l'homogénat à 10p100 (d=100).

3- Malicodéshydrogénase

- Réactions utilisées :

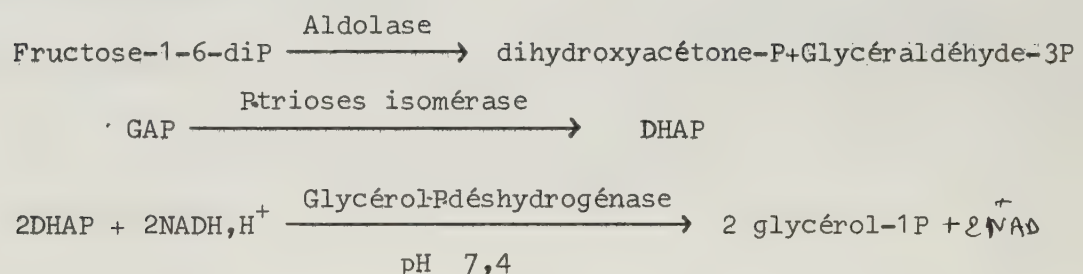


On suit également la diminution de la densité optique.

- Prise d'essai : 0,10ml d'une dilution au centième de l'homogénat à 10p100 (d = 100).

4- Fructose 1-6 diphosphate aldolase

- Réactions utilisées :

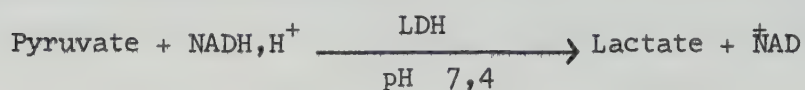


On suit donc, ici encore, la diminution de la densité optique. Il faut diviser ΔE par deux pour effectuer le calcul de cette activité enzymatique puisque deux molécules de NADH sont utilisées.

- Prise d'essai : 0,20ml d'une dilution au dixième de l'homogénat à 10p100 (d = 10).

5- Transaminase glutamique-pyruvique

- Réactions utilisées :



On suit, toujours, la diminution de la densité optique.

- Prise d'essai : 0,50ml d'une dilution au centième de l'homogénat à 10p100. (d = 100).

II- DOSAGE DES COMPOSES AZOTES HEPATIQUES

1- Dosage des protéines

Les protéines de l'homogénat total de foie et de la phase cytoplasmique ont été dosées par la méthode de GORNALL & coll. (188) utilisant la réaction du biuret.

Celle-ci a été préférée à la méthode de LOWRY & coll. (259), qui fait appel au réactif de FOLIN au phénol, car le rendement de la coloration par rapport à la quantité de protéines est plus constant d'une protéine à l'autre avec la réaction du biuret (304, 21). Il nous faut signaler que pour le dosage des protéines des homogénats totaux de foies stéatosés, il est nécessaire de faire un témoin avec un réactif de GORNALL sans cuivre afin d'éviter l'erreur par excès que provoquerait l'opalescence produite par des quantités importantes de lipides en présence du réactif.

2- Dosage de l'azote total

L'azote total hépatique a été déterminé sur les homogénats après minéralisation par la méthode de KJELDAHL, puis coloration par la réaction de BERTHELOT en utilisant l'autoanalyseur Technicon (16). Ce dosage est grandement facilité si l'on dilue au préalable les homogénats hépatiques avec un volume égal d'une solution de déoxycholate de sodium à cinq pour cent ce qui permet d'obtenir une émulsion homogène et clarifiée ne risquant pas de boucher le capillaire de prélèvement de l'échantillon à analyser.

III- METHODES D'ETUDE DES LIPIDES

A- ANALYSE QUANTITATIVE DES PRINCIPAUX CONSTITUANTS LIPIDIQUES

1- Dosage des lipides totaux

a - L'extraction et le dosage des lipides totaux hépatiques ont été réalisés par la méthode de FOLCH, LEES et SLOANE-STANLEY (152) que nous allons décrire, bien qu'elle soit classiquement utilisée en recherche, car, tout au long de notre travail, nous l'avons utilisée de façon régulière.

L'homogénéisation de la pulpe et l'extraction des lipides sont réalisées simultanément en traitant un gramme de pulpe avec environ 20ml d'un mélange chloroforme-méthanol 2-1 v/v dans l'appareil de THOMAS. L'extrait est ensuite transféré quantitativement dans une fiole jaugée de 25ml ; on rince l'appareil de THOMAS et ajuste au trait de jauge avec le mélange chloroforme-méthanol. Après mélange, l'extrait est filtré sur un filtre sans graisses et sans cendres et l'on en prélève 20ml que l'on introduit dans un tube à centrifuger à col rôdé; on ajoute 4ml d'une solution de chlorure de calcium à 0,05p100, bouche,

agite énergiquement pendant une minute et centrifuge pendant trente minutes à 3800t/mn et à +4°C de façon à obtenir deux phases limpides qui peuvent également se séparer après un repos d'environ douze heures. La phase supérieure est alors éliminée avec précaution par aspiration à la trompe à eau et on lave l'interface trois fois avec 3ml du mélange chloroforme-méthanol-CaCl₂ 0,02p100 (3/48/47, v/v) en éliminant, après chaque lavage, la phase surnageante. On ajoute ensuite 1ml de méthanol pour obtenir un extrait limpide que l'on transfère quantitativement dans un ballon de 100ml à fond rond et évapore à +4°C sous pression réduite à l'aide d'un évaporateur rotatif. Le résidu lipidique obtenu est repris par le mélange chloroforme-méthanol, filtré sur un filtre sans graisses et sans cendres dans un ballon préalablement taré puis à nouveau évaporé dans les mêmes conditions que précédemment. L'extrait lipidique sec ainsi obtenu est aussitôt placé dans un dessiccateur et maintenu sous vide pendant dix huit heures environ. Le poids de l'extrait est ensuite déterminé par pesée ce qui permet de calculer la teneur du foie en lipides totaux :

soit p le poids du résidu lipidique exprimé en milligrammes ;

P le poids de la prise d'essai de pulpe hépatique exprimé en grammes

$$\frac{p \times 1,25}{P} = \text{mg de lipides totaux par gramme de foie.}$$

Le résidu lipidique est alors aussitôt repris par un volume du mélange chloroforme-méthanol tel que l'on ait une concentration de l'ordre de 20mg de lipides par ml d'extrait, ce qui permet d'effectuer d'une part le dosage des différentes fractions lipidiques et, d'autre part, leur analyse chromatographique.

- b- La méthode de FOLCH & coll. est également appliquée au sérum sanguin lorsque l'on a à effectuer l'analyse chromatographique des différentes fractions lipidiques sériques ; il faut alors introduire la prise d'essai de sérum goutte à goutte et en agitant dans le mélange

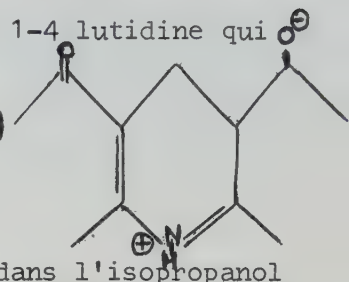
chloroforme-méthanol, on complète au volume désiré et continue comme dans le cas de la pulpe hépatique. Cependant, d'une façon plus simple, nous utilisons plutôt, pour doser les lipides totaux sériques, la méthode directe sans extraction de SCHMITZ (345) qui applique la réaction de CHABROL & CHARONNAT (38) au sérum après hydrolyse sulfurique. Elle présente l'avantage d'être une semi-microméthode puisque l'on peut utiliser une prise d'essai de 100 μ l voire de 50 μ l.

Nous avons également essayé d'appliquer cette méthode aux homogénats de foie dans de l'eau distillée lors des essais de tolérance générale, mais nous l'avons par la suite abandonnée car elle s'est révélée, dans ce cas, fort décevante.

2- Dosage des triglycérides

Les triglycérides sont dosés par la méthode fluorométrique semi-automatique de KESSLER & LEDERER (234) modifiée par CLAUDE & CORRE (97) et dont le principe est le suivant : la rupture des cénapses lipoprotéiques et l'extraction des lipides sont réalisées simultanément par de l'isopropanol (agiter pendant une minute et laisser en contact pendant quinze minutes) ; les lipides polaires, notamment les phospholipides, et certaines substances qui peuvent interférer (glucose, acides organiques, bilirubine) sont ensuite éliminés par adsorption grâce à l'addition d'un mélange comprenant une résine échangeuse d'ions la zéolite, du sulfate cuivrique, de la chaux et une bentonite (laisser en contact pendant trente minutes en agitant de temps en temps). Après filtration, les triglycérides vont pouvoir être dosés de façon automatique (Autoanalyseur Technicon) : une saponification à + 50°C par une solution isopropanolique de potasse entraîne la libération de glycérol qui va être oxydé par l'acide métapériodique en formaldéhyde ; c'est ce dernier corps qui sera finalement dosé en appliquant la réaction de HANTZSCH (286) : condensation à pH 6,0 et à

+ 50°C entre le formaldéhyde, l'acétylacétone et l'acétate d'ammonium avec formation de la diacétyl 3-5, dihydro 1-4 lutidine qui est fluorescente (longueur d'onde d'excitation : 405 nm ; longueur d'onde de fluorescence : 485 nm) et dont on mesure la concentration par fluorométrie. Parallèlement et dans les mêmes conditions sont traitées des solutions étalons de trioléine dans l'isopropanol (250, 500, 750 et 1000 µg/ml).



Cette méthode est appliquée soit au sérum sanguin, soit à l'extrait lipidique hépatique en solution dans le chloroforme-méthanol ; dans ce dernier cas, il est nécessaire d'évaporer à sec, au préalable, cet extrait de manière à éliminer le méthanol qui interférerait au cours du dosage.

La quantité de lipides nécessaires dans la prise d'essai est de l'ordre de 2mg ; il est bien évident que celle-ci devra être diminuée dans le cas des foies présentant une stéatose macroscopique.

Nous avons remarqué que certains sérums très hémolysés donnaient des chiffres de triglycérides très élevés et tout à fait hors de proportion avec la quantité de lipides totaux sériques. On peut éliminer cette interférence en utilisant le protocole suivant : évaporation d'une partie aliquote de l'extrait isopropanolique ; reprise par un volume égal de chloroforme, triple lavage de l'extrait par agitation avec une solution de chlorure de calcium à 0,05p100 en décantant, à chaque fois, la phase surnageante, addition d'un peu de méthanol pour obtenir une solution limpide que l'on évapore à +40°C sous pression réduite ; le résidu est repris par un volume d'isopropanol identique au volume initial.

3- Dosage du cholestérol total

Le cholestérol total sérique est dosé par la méthode automatique d'ETIENNE, PAPIN & H. RENAULT (140) qui présente l'avantage d'être une semi-microméthode, la prise d'essai de sérum étant inférieure à 100 μ l.

Le cholestérol total hépatique est déterminé sur la solution d'extrait lipidique, dans le chloroforme-méthanol, après évaporation du solvant et reprise du résidu par du chloroforme, en utilisant la réaction colorée de LIEBERMANN-BURCHARD (191). La quantité de lipides présents dans la prise d'essai doit être de l'ordre de 4mg. L'étalonnage est réalisé avec une solution chloroformique de cholestérol dont la concentration est de 400 μ g par ml.

4- Dosage des phospholipides

Les phospholipides sont dosés dans le sérum après précipitation des lipoprotéines par l'acide trichloracétique à quatre pour cent et lavage du précipité avec de l'eau bidistillée. Dans le foie, on opère sur la solution de l'extrait lipidique dans le chloroforme-méthanol, la prise d'essai devant être de 1mg de lipides environ.

Le culot de lipoprotéines sériques et l'extrait lipidique hépatique sont carbonisés par chauffage en présence d'acide sulfurique concentré ; le liquide est ensuite décoloré par action du mélange à parties égales d'acide nitrique concentré et d'acide perchlorique à 70p100 à chaud jusqu'à élimination complète des vapeurs nitreuses. Après hydrolyse au bain-marie bouillant de l'acide pyrophosphorique qui s'est éventuellement formé lors de la minéralisation le dosage du phosphore est effectué selon la méthode de BRIGGS (62) appliquée au minéralisat sulfonitroperchlorique. L'étalonnage est réalisé avec une solution de phosphate monopotassique contenant 10 μ g de phosphore correspondant à 250 μ g de phospholipides par ml.

Le calcul de la concentration de chacun des paramètres lipidiques hépatiques (triglycérides, cholestérol total, phospholipides) est réalisé en effectuant le rapport :

$$\frac{\mu\text{g paramètre/PE} \times \text{mg lipides totaux/g foie}}{\text{mg lipides/PE} \times 1000}$$

PE désignant le volume de la prise d'essai de la solution d'extrait lipidique hépatique dans le chloroforme-méthanol exprimé en ml.

Il est alors possible de calculer la quantité totale de lipides et de chaque paramètre lipidique dans le foie en multipliant la concentration de chacun d'eux en mg/g par le poids du foie en grammes.

5- Dosage des acides gras non estérifiés plasmatiques

Les acides Gras Non Estérifiés (AGNE) sont déterminés sur le plasma hépariné par la méthode semi-automatique d'ANTONIS (12). Il nous faut insister sur le fait, classique, que l'extraction des AGNE doit être réalisée le plus rapidement possible après le prélèvement du sang qui est effectué sur héparine et centrifugé aussitôt à +4°C ; les lipides plasmatiques sont immédiatement extraits par l'éther diisopropylique, privé de peroxydes par chromatographie sur alumine, en présence d'acide silicique qui adsorbe les lipides polaires et notamment les phospholipides. Après repos, une partie aliquote du surnageant est prélevée avec précaution, afin de ne pas entraîner de particules d'acide silicique, puis évaporée sous pression réduite d'abord à froid puis à + 40°C. Après refroidissement, on reprend par un volume identique de chloroforme. L'extrait chloroformique, est soumis à l'analyse automatique basée sur la formation de sels de cuivre des acides gras solubles dans le chloroforme puis sur la complexation du cuivre de ces savons sous forme de diéthylthiocarbamate et enfin sur la mesure colométrique de ces complexes à 440 nm. L'étalonnage est réalisé

directement avec des solutions chloroformiques d'acide palmitique ; le rendement de l'extraction étant, en effet, de $101,5 \pm 1,4\%$.

Il faut formellement proscrire tout matériel en chlorure de polyéthylène qui serait dissous par le chloroforme et utiliser, par conséquent, un matériel spécial : godets en verre, couvercle du plateau distributeur d'échantillons en acier inoxydable et tubes de pompe des solutions chloroformiques en "Acidflex".

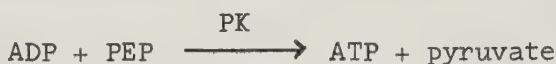
6- Dosage du glycérol sérique

Le glycérol est dosé par la méthode enzymatique spectrophotométrique de KREUTZ (242) dont le principe est le suivant :

- phosphorylation du glycérol par l'ATP sous l'action de la glycérokinase :



- l'ADP formé est rephosphorylé, en présence de phosphoénolpyruvate, par la pyruvate kinase :



- Le pyruvate formé est réduit en lactate par la lacticodéshydrogénase. La quantité de NADH oxydée, donc la diminution de la densité optique à 340 nm, étant proportionnelle à la quantité de glycérol initiale :



Ces trois réactions sont effectuées en milieu tamponné à pH 7,6 en présence d'ions magnésium et à + 25°C.

Cette méthode, assez facile à appliquer au sérum humain, pose, par contre, dans le cas du sérum du rat, un certain nombre de problèmes.

Tout d'abord, si l'on effectue le dosage avec la prise d'essai habituellement utilisée pour le sérum humain (0,50 ml), on obtient une variation très faible de la densité optique, voire nulle, vraisemblablement en raison de la présence plus abondante dans le sérum de rat de substrats (pyruvate ?) qui consomment du NADH et de la LDH. Ces deux corps se trouvent alors en quantité insuffisante pour intervenir dans les réactions de dosage du glycérol : il faut donc utiliser une prise d'essai inférieure à 0,50 ml.

D'autre part, nous avons constaté que, dans nos prélèvements, la concentration en glycérol du sérum de rat n'était pas aussi stable que celle du sérum humain, et augmentait assez rapidement. Pour éviter cette erreur par excès, on laisse rétracter le caillot à + 4°C, centrifuge à + 4°C le prélèvement, décante le sérum et on le défèque avec un volume égal d'acide perchlorique 0,6N. Après centrifugation à + 4°C, ce défécât est décanté puis neutralisé et privé des ions perchlorate par addition de 0,33 volume d'une solution de phosphate dipotassique 2,2M; on laisse précipiter le perchlorate de potassium dans un bain de glace pendant dix minutes puis centrifuge à + 4°C et effectue le dosage sur le surnageant décanté et ramené à la température de + 25°C en utilisant les réactifs des "Biochemica Test Combinations" BOEHRINGER (376) selon le protocole suivant : dans une cuve en quartz, mesurer :

tampon triéthanolamine 0,1M, pH 7,6+MgSO ₄ 0,004M	2,50 ml
NADH 0,006M + ATP 0,033M + PEP 0,011M	0,10 ml
défécât privé de ClO ₄ ⁻	0,50 ml
suspension LDH + PK	0,02 ml

Mélanger, attendre la fin de la réaction initiale (réduction du pyruvate) soit pendant 10 mn. Mesurer E₁, puis ajouter :

suspension GK	0,02 ml
---------------------	---------

mélanger, attendre la fin de la réaction, soit pendant 10 minutes.

Mesurer E_2 . Il faut noter que l'on obtient un palier aussi bien pour E_1 que pour E_2 , ce qui n'est pas le cas avec le sérum pur qui donne deux droites inclinées, mais parallèles; ceci rendait la mesure de la variation de densité optique plus délicate.

D'autre part, on effectue un dosage "à blanc", c'est-à-dire en remplaçant le sérum par du soluté isotonique de chlorure de sodium au cours des différentes manipulations, de manière à tenir compte de la variation de densité optique due au mélange des réactifs eux-mêmes (E_B).

La variation de densité optique ΔE est donc égale à :

$$\Delta E = E_1 - (E_2 - E_B)$$

Le calcul de la concentration du glycérol dans le sérum est le suivant :

$$\text{mM glycérol/l} = \frac{\Delta E \times 3,14}{6,22 \times 0,1875} = \Delta E \times 2,69$$

B- ANALYSE CHROMATOGRAPHIQUE DES DIVERSES FRACTIONS LIPIDIQUES

La chromatographie en couche mince d'acide silicique nous a permis, d'une part, de fractionner les principales classes de lipides et, d'autre part, de séparer les diverses fractions phospholipidiques. Dans les deux cas nous opérons sur l'extrait lipidique en solution dans le mélange chloroforme méthanol (2/1 en volumes) dont on dépose, sur une largeur de 2 cm, 50 μ l soit sensiblement 1mg de lipides.

1- Fractionnement des principales classes de lipides

Les principales classes de lipides ont été fractionnées par la méthode de FREEMAN & WEST (160) en utilisant les plaques d'acide silicique contenant un indicateur fluorescent non organique excitable à 254nm (plaques de gel de silice H "Merck" 20x20cm, épaisseur de la couche : 250 μ). Le développement du chromatogramme est réalisé avec deux systèmes de solvants dont la composition et les conditions d'utilisation sont les suivantes :

- <u>Système 1</u> :	éther diéthylique	40 volumes
	benzène	50 volumes
	éthanol	20 volumes
	acide acétique	0,2 volume

On laisse le développement se réaliser sur une distance de 11,5 cm, soit pendant 35 minutes environ. Ce premier système permet la séparation des principales classes de lipides à l'exception des triglycérides et des esters du cholestérol qui migrent ensemble pratiquement avec le front du solvant.

Les plaques sont retirées, séchées à l'air pendant quelques minutes puis dans une étuve à + 50°C afin d'éliminer les traces d'acide acétique et enfin placées, après refroidissement, dans une cuve contenant le deuxième mélange de solvants.

- <u>Système 2</u> :	éther diéthylique	6 volumes
	n-hexane	94 volumes

On laisse le front du solvant migrer jusqu'à 1 cm du trait supérieur de la plaque soit pendant environ une heure ; on retire la plaque, on la sèche à l'air pendant quelques minutes puis dans une étuve à + 50°C pendant 30 minutes. Ce deuxième système permet la séparation des triglycérides et des esters du cholestérol.

Les plaques peuvent alors être révélées par exposition à des vapeurs d'iode, cette révélation présentant l'avantage d'être très sensible et réversible ; la sensibilité est encore améliorée en combinant la révélation aux vapeurs d'iode et l'observation en lumière ultraviolette à 254nm. Pour obtenir une révélation durable, les plaques sont imprégnées d'acide sulfurique à 50p100 par pulvérisation puis séchées à + 120°C pendant quinze minutes.

Après révélation, on peut donc observer les fractions lipidiques suivantes citées par ordre de Rf croissant :

- phospholipides à l'origine
- monoglycérides
- acides gras non estérifiés
- cholestérol libre
- diglycérides
- triglycérides
- esters du cholestérol.

2- Séparation des diverses fractions phospholipidiques

La séparation des fractions phospholipidiques a été réalisée par la méthode de ROBINSON & PHILLIPS (324) qui utilise, comme adsorbant de l'acide silicique contenant 13p100 de sulfate de calcium comme liant (gel de silice G "Merck"). Les résultats les plus favorables sont obtenus avec des couches de 0,5 mm d'épaisseur. Le système développant est constitué par le mélange suivant :

chloroforme	65 volumes
méthanol	25 volumes
eau distillée	4 volumes

On laisse la migration se réaliser sur une distance de 12 cm soit pendant cinquante minutes environ. Les plaques sont retirées, séchées à l'air pendant quelques minutes puis dans une étuve à + 50°C pendant trente minutes

et enfin révélées, après refroidissement, par exposition aux vapeurs d'iode.

On peut alors observer les fractions suivantes, citées par ordre de Rf croissant :

- lysophosphatidylcholine (lysolécithines)
- deux bandes de sphingomyélines
- phosphatidylcholine (lécithines)
- phosphatidylinositol
- phosphatidylsérine
- phosphatidyléthanolamine
- lipides neutres avec le front du solvant.

IV- TECHNIQUES D'ETUDE DES β -LIPOPROTEINES

Les β -lipoprotéines (lipoprotéines "VLDL" et "LDL") ont été isolées par la méthode de BURSTEIN (71) basée sur leur précipitation par le phosphotungstate de sodium à pH sensiblement neutre et en présence de chlorure de magnésium.

Une étude préliminaire a tout d'abord été faite pour s'assurer que les conditions de précipitation des β -lipoprotéines du sérum du rat étaient identiques à celles utilisées pour les β -lipoprotéines humaines.

1- Etude préliminaire

Les β -lipoprotéines sériques humaines ont donc été isolées par la méthode de BURSTEIN (71). Sur la solution finale obtenue ont été dosés les triglycérides, le cholestérol total, les phospholipides et les protéines totales en utilisant les techniques que nous avons précédemment indiquées ; nous avons effectué, d'autre part, une électrophorèse auto-

matique en veine liquide et en gradient de saccharose (362) suivant un protocole que nous décrirons à propos du contrôle de la pureté des β -lipoprotéines de rat.

Nous avons, en outre, appliqué cette méthode de BURSTEIN à une préparation de β -lipoprotéines pures que nous avait aimablement procurée M. CANAL et qui avait été obtenue par précipitation par le sulfate de dextrane en présence de chlorure de calcium (72), suivie d'une dissociation du complexe par ultracentrifugation à une densité de 1,063 ; la pureté de la fraction avait été ensuite contrôlée par électrophorèse sur acétate de cellulose.

Cette étude préliminaire a montré que la précipitation des β -lipoprotéines sériques humaines selon BURSTEIN (71) permettait d'obtenir une fraction pure, non souillée d'autres protéines et ayant le même comportement électrophorétique en veine liquide que les β -lipoprotéines isolées par précipitation par le sulfate de dextrane puis dissociation du complexe par ultracentrifugation. L'électrophorèse automatique en veine liquide et en gradient de saccharose semble ainsi tout à fait satisfaisante pour contrôler la pureté des fractions isolées.

Les proportions des principaux constituants de ces β -lipoprotéines humaines sont les suivantes : triglycérides 21,7p100; cholestérol total 35,9p100; phospholipides 21,8p100 et protéines totales 17,7p100.

Dans le cas du sérum de rat, il est par contre nécessaire de modifier légèrement cette méthode, notamment pour en augmenter la sensibilité.

2- Technique utilisée

Le protocole finalement adopté est le suivant :

Sérum	2 ml
Phosphotungstate de sodium 4p100, pH 7,5 ...	0,5ml
Chlorure de magnésium 2M	0,2ml

Après repos pendant dix minutes, on centrifuge à 4000t/mn et à + 20°C pendant vingt minutes. Le surnageant est éliminé et le culot est lavé trois fois avec 2ml d'une solution de chlorure de magnésium 0,1M contenant 1p100 de chlorure de sodium, puis dissout à + 37°C dans 2ml d'une solution de citrate trisodique à 2g/l. On reprécipite les β -lipoprotéines par addition de 0,10ml de phosphotungstate et 0,06ml de $MgCl_2$ 2M; on centrifuge, élimine le surnageant, dissout le culot dans 2ml de citrate à 2g/l. On effectue une précipitation avec 0,05 ml de phosphotungstate et 0,06ml de $MgCl_2$ 2M et enfin une dernière précipitation avec 0,06ml de $MgCl_2$ 2M et 20mg de chlorure de sodium. Après repos pendant dix minutes on centrifuge à 4000t/mn et à + 20°C pendant une durée identique, élimine le surnageant et dissout le culot de β -lipoprotéines dans 2ml de solution de citrate trisodique à 10p100.

3- Etude des β -lipoprotéines de rat

a- Contrôle de la pureté

Le contrôle de la pureté des β -lipoprotéines ainsi obtenues est réalisé par électrophorèse automatique ("Autophorèse" Technicon) en veine liquide et en gradient de saccharose (362) selon le protocole suivant : les préparations de β -lipoprotéines sériques de rat étant peu concentrées, il est tout d'abord nécessaire, pour accroître la sensibilité, d'augmenter la section du tube d'arrivée de la dilution de β -lipoprotéines dans la cuve de l'appareil.

L'échantillon à analyser est prélevé puis introduit dans la cuve ; après l'arrêt des pompes et dès que le courant commence à traverser celle-ci, (avec une intensité de 20 mA), on déclenche le chronomètre. A la deuxième minute on effectue un premier enregistrement de la séparation des fractions protéiques éventuellement présentes en provoquant le déplacement de la cuve devant un rayonnement ultra-violet dont la longueur d'onde est de 280 nm ("scanning") pendant une minute ; il faut

prendre la précaution d'inverser manuellement le sens de rotation du moteur de la cuve pour permettre le retour de celle-ci à sa position initiale de manière à pouvoir réaliser, à la sixième minute, un nouvel enregistrement et enfin, si la concentration de la préparation le permet, un troisième enregistrement à la dixième minute.

On effectue au préalable, une analyse électrophorétique du solvant (solution de citrate à 10p100), afin d'éliminer l'interférence provoquée par l'absorption propre de celle-ci et, d'autre part, les éventuelles irrégularités de la cuve qui pourraient gêner l'interprétation du tracé en faisant croire qu'il existe des impuretés dans la préparation.

L'utilisation de cette technique d'électrophorèse nous a ainsi permis de constater que la méthode de précipitation utilisée conduit à l'obtention de β -lipoprotéines de sérum de rat pures, exemptes d'autres protéines, et dont la vitesse de migration est légèrement supérieure à celle des β -lipoprotéines du sérum humain.

b- Dosage des principaux constituants

Sur la solution de β -lipoprotéines sériques de rat sont dosés, les triglycérides, le cholestérol total, les phospholipides et les protéines totales par les techniques que nous avons déjà exposées. Dans le cas du dosage des protéines totales, il est nécessaire, non seulement, de faire un témoin avec un réactif de GORNALL sans sulfate cuivrique, mais encore de centrifuger le milieu réactionnel pendant cinq minutes à 4000t/mn et à 20°C avant de procéder à la mesure spectrophotométrique.

Les proportions des principaux constituants de ces β -lipoprotéines sériques de rat sont les suivantes : triglycérides 15,5p100; cholestérol total 22,1p100; phospholipides 38,9p100; protéines totales 24,5p100.

Il nous faut signaler, enfin, que l'on a essayé d'utiliser une méthode de précipitation voisine pour isoler les β -lipoprotéines du foie de rat à partir de la "phase soluble" hépatique comme l'ont réanalysé ALBANO & FRANCAVILLA au cours de leurs travaux sur l'intoxication expérimentale du rat par le tétrachlorure de carbone (5, 6). Seulement, si ces " β -lipoprotéines hépatiques" isolées selon le protocole proposé par ces auteurs ont une vitesse de migration voisine de celle des β -lipoprotéines sériques en électrophorèse en veine liquide, elles se révèlent par contre, à l'analyse, très riches en protéines (plus de 95p100), très pauvres en lipides (les diverses fractions lipidiques ne sont présentes qu'en très faibles quantités) ; de plus, elles n'incorporent pratiquement pas d'acide palmitique tritié. Contrairement à ce qu'indiquent ALBANO & FRANCAVILLA, il ne nous a pas semblé possible d'utiliser un matériel si suspect au cours de nos expérimentations.

V- METHODES D'ETUDE RADIOISOTOPIQUES

Les méthodes radioisotopiques auxquelles nous avons fait appel pour explorer le métabolisme lipidique des animaux intoxiqués par le phosphore blanc ont consisté essentiellement en la mesure de l'incorporation de l'acide palmitique marqué au tritium dans les β -lipoprotéines sériques et dans les lipides hépatiques.

A- PREPARATION DE LA SOLUTION D'ACIDE PALMITIQUE TRITIE

Les acides gras non estérifiés circulant dans le sang sous forme complexe avec l'albumine, il est donc nécessaire, pour étudier leur incorporation dans les principales molécules lipidiques, de les introduire par voie intraveineuse sous forme de leur sel de sodium lié à l'albumine.

L'acide gras utilisé est l'acide palmitique marqué au tritium en position 9 et 10, d'activité spécifique de 40 curies/mM fourni par le C.E.A. de Saclay en solution dans l'hexane. L'acide palmitique ^3H -9-10 va devoir être solubilisé en milieu aqueux sous forme de palmitate de sodium lié à l'albumine dans la proportion de 1 μg de palmitate de sodium pour 60 μg d'albumine (251).

Cet acide palmitique tritié est tout d'abord purifié par recristallisation : la solution dans l'hexane est évaporée sous pression réduite après surcharge avec de l'acide palmitique "froid" (environ 10mg). Les cristaux formés sont dissous dans l'éthanol chaud et la préparation obtenue est diluée d'un tiers avec une solution sensiblement normale d'acide chlorhydrique. On laisse précipiter pendant 12 heures à + 4°C et les cristaux d'acide palmitique sont recueillis sur un filtre sans cendres et sans graisses préalablement taré, puis séchés à une température maximale de + 50°C. Après refroidissement et pesée, ils sont dissous en versant de l'éthanol chaud sur le filtre. La solution alcoolique est recueillie dans une fiole jaugée, ajustée au volume final avec de l'éthanol et l'activité est mesurée sur 100 μl d'une dilution au centième. On peut alors préparer la solution de palmitate-albumine en utilisant le protocole que nous a obligeamment indiqué Ph. LAUDAT, qui est dérivé de celui de FELTS & MAJORO (145) et de BORGSTRÖM & OLIVECRONA (48) :

Une partie aliquote de la solution alcoolique d'acide palmitique ^3H -9-10 est additionnée de soude 0,02N jusqu'à observation d'un léger louche ; après évaporation à sec sous pression réduite on obtient un résidu de palmitate de sodium que l'on dissout dans l'eau distillée au bain-marie vers + 50°C ; on prépare simultanément, une solution d'albumine bovine (fraction V Sigma) que l'on porte à une température voisine de 0°C et l'on verse d'un seul coup la solution d'albumine froide dans celle de palmitate de sodium chaude ; on bouche le tube et agite aussitôt énergiquement de manière à obtenir une solution limpide de palmitate de sodium ^3H -9-10 lié à l'albumine dont on mesure l'activité qui

est de l'ordre de $20 \mu\text{c}/0,20\text{ml}$, quantité utilisée pour étudier l'incorporation de l'acide palmitique.

B- CONDITIONS EXPERIMENTALES DE L'ETUDE DE L'INCORPORATION DE L'ACIDE PALMITIQUE ^3H -9-10

Pour réaliser cette étude, il nous a paru essentiel que tous les animaux soient traités dans des conditions aussi identiques que possible et c'est la raison pour laquelle nous avons décidé de mesurer l'incorporation de l'acide palmitique ^3H -9-10 chez les rats préalablement anesthésiés par l'uréthane. Un essai préliminaire que nous décrirons dans la cinquième partie a permis de fixer le protocole suivant (t_s représentant le moment où les animaux sont sacrifiés) :

- A t_s -45mn, les rats sont anesthésiés par de l'uréthane administré en solution aqueuse à 20p100 à la dose de 1,25g/kg par voie intrapéritonéale.
- A t_s -30mn, la solution de palmitate-albumine est injectée dans la veine du pénis : on injecte tout d'abord 0,10ml de soluté isotonique de chlorure de sodium puis les 0,20ml de la solution de palmitate-albumine que l'on pousse avec 0,20ml de soluté isotonique de chlorure de sodium. Le chronomètre est déclenché à la fin de l'injection de palmitate-albumine.
- A t_s , on saigne les animaux par ponction de l'aorte abdominale avec une seringue en plastique de 10ml ; le sang est donc recueilli et l'on prélève rapidement le foie que l'on place dans un bécher contenant du soluté isotonique de chlorure de sodium maintenu à $+ 4^\circ\text{C}$.

D'autre part, on anesthésie et sacrifie un rat n'ayant pas reçu de traceur, ce qui va permettre de préparer les divers échantillons servant de blancs pour la mesure de la radioactivité.

C- PREPARATION DES ECHANTILLONS

Les mesures de radioactivité sont effectuées d'une part sur les β -lipoprotéines sériques et d'autre part sur les lipides hépatiques.

1- β -lipoprotéines sériques

On laisse se rétracter le caillot à + 4°C et, après centrifugation et décantation du sérum, les β -lipoprotéines sont préparées selon la technique que nous avons indiquée. Sur la solution citratée de β -lipoprotéines sont réalisés un contrôle de la pureté par électrophorèse en veine liquide et gradient de saccharose, un dosage des triglycérides et des protéines, une mesure de la radioactivité.

Pour réaliser cette dernière, le problème à résoudre consistait à introduire la solution de lipoprotéines dans le mélange scintillant. Les premiers essais ont été effectués en déposant progressivement 100 μ l de la solution citratée de β -lipoprotéines sur un disque WHATMAN GF/C de 2,1cm de diamètre que l'on sèche à l'air chaud avant de l'introduire dans un flacon de comptage. L'inconvénient d'un tel procédé était double :

- d'une part, il s'est révélé peu pratique ne donnant pas toujours des résultats très reproductibles, car si la dessiccation des disques est trop poussée ceux-ci peuvent se désagréger en morceaux de taille variable lors de leur introduction dans le flacon de comptage ;
- d'autre part, il ne permettait pas de déterminer de façon simple le "quenching" (cf. plus loin) et, par conséquent, de comparer les activités mesurées dans ces β -lipoprotéines sériques et dans les lipides hépatiques.

Aussi avons-nous fait appel à l'action solubilisante du solvène-100 (Packard) utilisé dans les conditions suivantes :

dans un flacon de comptage, introduire successivement :

solution citratée de β -lipoprotéines	100 μ l
soluène-100	1ml

Mélanger avec précaution ; laisser en contact pendant une heure à la température du laboratoire de façon à obtenir une solution parfaitement limpide.

Il est indispensable, dans le cas des β -lipoprotéines en solution dans du citrate à 10p100, de respecter le rapport de 1/10 avec le soluène-100 pour obtenir un mélange limpide. La solution de palmitate-albumine est introduite également dans ces conditions (100 μ l d'une dilution au centième dans le soluté isotonique de chlorure de sodium).

2- Lipides hépatiques

Le foie est réduit en pulpe dont une partie aliquote sert à préparer un homogénat au dixième dans le soluté isotonique de chlorure de sodium et que l'on centrifuge pendant une heure à 4000t/mn et à +4°C. La pellicule lipidique surnageante est recueillie avec précaution, lavée quatre fois avec du NaCl 0,15M en centrifugeant à + 4°C et récupérant le surnageant ; les triglycérides sont extraits par du chloroforme.

Après agitation énergique, on laisse les phases aqueuse et chloroformique se séparer, puis élimine la phase aqueuse supérieure et sur la phase chloroformique on effectue d'une part un dosage de triglycérides et d'autre part une mesure de la radioactivité.

L'autre partie de la pulpe hépatique est utilisée pour l'extraction des lipides par la méthode de FOLCH & coll. (152). Sur l'extrait lipidique en solution dans le mélange chloroforme-méthanol (2/1 en volumes) on effectue :

- un dosage des principaux constituants lipidiques (triglycérides, cholestérol total, phospholipides) ;
- une mesure de la radioactivité totale ;
- une mesure de la radioactivité après dépôt sur une plaque de gel de silice H, récupération du gel et élution par le mélange chloroforme-méthanol (2/1 en volumes), afin d'apprécier le pourcentage de la radioactivité récupérée à partir des plaques ; le rendement, calculé sur 29 échantillons, est de $76,3 \pm 14,3\%$;
- une séparation des fractions lipidiques par chromatographie en couche mince (160). Les plaques sont d'abord révélées par observation à la lumière ultraviolette à 254nm pour repérer et marquer les zones correspondant aux phospholipides ; celles-ci sont alors recueillies par grattage et le gel est transféré dans un flacon de comptage. Les plaques sont ensuite exposées pendant quelques minutes aux vapeurs d'iode afin de repérer et marquer les zones correspondant aux triglycérides ; après élimination des vapeurs d'iode en plaçant la plaque dans une étuve à + 50°C, les triglycérides sont récupérés comme les phospholipides. Ces deux fractions sont alors éluées, dans le flacon de comptage-même, par addition de 1ml du mélange chloroforme-méthanol et agitation soigneuse ; on laisse en contact une heure à la température du laboratoire.

D- MESURE DE LA RADIOACTIVITE

Les mesures de radioactivité ont été effectuées à l'aide du spectromètre à scintillation liquide "Nuclear Chicago Mark I",

1- Comptage

L'activité des divers échantillons est mesurée après addition de 10ml du mélange scintillant dont la composition est la suivante :

2,5-diphényl-oxazole (PPO) 3 g
2,2'-p-phénylène-bis-(5-phényloxazole) (POPOP).... 0,1g
Toluène qsp . 1000ml

On mélange avec soin, laisse reposer pendant une heure les flacons contenant du gel de silice, et mesure l'activité des différents échantillons. Ceux-ci ont été comptés pendant une durée suffisante pour avoir une erreur statistique inférieure à 5p100.

On obtient ainsi un certain nombre de coups par minute (CPM).

2- Mouvement propre

On soustrait du taux de comptage la valeur du mouvement propre qui est caractéristique de l'appareil et de la nature des différents échantillons.

Cette correction est réalisée en mesurant l'activité des échantillons préparés à partir d'un rat n'ayant pas reçu de traceur.

3- Rendement

Le rendement de comptage a été déterminé au moyen de toluène ^3H (New England Nuclear Corp.). Il est fonction de la composition de l'échantillon ; en effet, l'addition d'un milieu étranger au mélange scintillant provoque une diminution du taux de comptage par suite d'un effet d'extinction partielle de la fluorescence ("quenching"). L'intensité de cette autoextinction est fonction de la nature et de la quantité de la substance introduite au sein du mélange scintillant. Il est donc indispensable, pour contrôler la valeur de l'autoextinction, d'ajouter à chacun des échantillons un étalon interne qui est ici du toluène ^3H dont l'activité spécifique est $2 \times 10^6 \text{ DPM/ml}$.

Chaque échantillon est compté une première fois, puis une seconde fois après addition de $100 \mu\text{l}$ d'une dilution au dixième de toluène ^3H

Pour déterminer la valeur exacte de la surcharge, on introduit celle-ci dans un flacon ne contenant que 10 ml du mélange scintillant. Pour les différents types d'échantillons que nous avons analysés, les rendements sont les suivants (non corrigés du rendement du compteur pour le tritium, qui est constant pour tous les échantillons) :

- β -lipoprotéines en solution dans le citrate à
10p100 (100 μ l) 84,1 $\pm$ 1,2p100
- "Graisse flottante" hépatique en solution chloroformique (100 μ l) 73,0 $\pm$ 2,0p100
- Lipides hépatiques en solution dans le mélange chloroforme-méthanol (100 μ l) 75,6 $\pm$ 4,0p100
- Fractions lipidiques sur gel, éluées par 1ml du mélange chloroforme-méthanol 23,0 $\pm$ 2,0p100

Il faut noter, dans ce dernier cas, que la pellicule de gel de silice déposée au fond des flacons de comptage ne donne pratiquement pas d'interférence pour des quantités allant de 32,5 à 211,4 mg. C'est uniquement le volume relativement important (1 ml) du mélange chloroforme-méthanol (2/1 en volumes) qui est responsable du "quenching" marqué pour ces échantillons.

4- Calculs

a- Correction du mouvement propre

Le nombre de CPM trouvés pour la prise d'essai de l'échantillon est tout d'abord corrigé du mouvement propre en soustrayant de sa valeur le nombre de CPM trouvés pour le blanc correspondant à chaque type d'échantillon.

$$A = \text{CPM de l'échantillon} - \text{CPM du blanc.}$$

b- Correction du "Quenching"

Il faut ensuite, procéder à la correction de l'autoextinction :
si l'on désigne par :

- B le nombre de CPM de l'échantillon surchargé avec l'étalon interne,
- C le nombre de CPM de l'étalon interne,

le facteur de correction X est alors égal au rapport :

$$X = \frac{B - A}{C} \quad (X \leq 1)$$

Le nombre de CPM corrigé du mouvement propre et du "Quenching" Y est donc égal au rapport :

$$Y = \frac{A}{X}$$

Pour calculer l'activité réellement injectée, il faut, de plus, tenir compte du rendement du compteur (43,2p100 pour le tritium) (ceci n'est pas nécessaire dans le cas des échantillons puisqu'ils sont tous comptés dans les mêmes conditions techniques). On obtient donc, pour la solution du traceur, un nombre de désintégrations par minute (DPM) que l'on peut transformer en microcurie sachant que $1 \mu C = 2 \times 10^6$ DPM.

c- Calcul de l'activité spécifique (AS)

L'activité spécifique représente le pourcentage de la dose injectée par milligramme de triglycérides (β -lipoprotéines sériques, "graisse flottante" et triglycérides hépatiques) ou de lipides (lipides totaux hépatiques) ou de phospholipides (phospholipides hépatiques) et normalisé à 100 g de poids corporel.

$$AS = \text{CPM/mg} \times \frac{\text{poids du corps (g)}}{100} \times \frac{100}{\text{CPM injectés}}$$

d- Calcul de l'activité totale (AT)

On peut, de plus, calculer, l'activité totale qui représente le pourcentage de la dose injectée dans la totalité du paramètre biologique considéré dans le sérum et le foie.

- cas du sérum :

$$AT = \text{CPM/mg} \times \text{mg/rat} \times \frac{100}{\text{CPM injectés}}$$

Pour déterminer la quantité de β -lipoprotéines totales sériques (mg/rat) on utilise, pour le volume sérique, la valeur de 5,40ml/100g de poids corporel (257).

- cas du foie :

$$AT = \text{CPM/mg} \times \text{mg/foie} \times \frac{100}{\text{CPM injectés}}$$

Tous ces calculs ont été faits à l'aide d'une calculatrice électronique à programme enregistré (Programma 101 Olivetti) d'après un programme que nous avons mis personnellement au point.

C'est également à l'aide de cette calculatrice que nous avons procédé à l'interprétation statistique des différents résultats obtenus, problème que nous allons aborder maintenant.

VI- METHODES D'ANALYSE STATISTIQUE

Pour chaque série d'analyses sont calculés : la moyenne arithmétique m des résultats individuels x et l'écart-type s :

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x-m)^2}{n-1}}$$

$n-1$ représentant le nombre de degrés de liberté de la série de mesures étudiée. La comparaison entre les moyennes observées chez les animaux témoins et chez ceux intoxiqués est effectuée en utilisant le test "t" de STUDENT & FISHER (349)

$$t = \frac{m_1 - m_2}{\sqrt{\frac{s^2}{n_1} + \frac{s^2}{n_2}}}$$

s^2 désignant l'estimation de la variance, supposée commune :

$$s^2 = \frac{\sum(x-m_1)^2 + \sum(x-m_2)^2}{n_1 + n_2 - 2}$$

La différence est significative si la valeur absolue de t est supérieure à celle figurant dans la table de t pour un nombre de degrés égal à $n_1 + n_2 - 2$ et de risque 5p100 ($p < 0,05$). Le signe de t indique le sens de la variation : augmentation si t est négatif, diminution si t est positif.

Il faut préciser que, théoriquement, le test n'est possible que si les deux variances ne diffèrent pas significativement l'une de l'autre, ce qui est déterminé en calculant le rapport $F = \frac{s_1^2}{s_2^2}$ dans lequel s_1^2 est supérieur à s_2^2 ; si F est inférieur à la valeur F_s donnée par la table "point 2,5p100", les deux variances ne diffèrent pas significativement ; elles diffèrent significativement dans le cas inverse (349).

Dans les tableaux où sont portés les différents résultats, nous indiquerons lorsque l'analyse statistique a été possible, la valeur de p quand les moyennes diffèrent significativement, et les initiales N.S. quand la différence entre les moyennes n'est pas significative.

QUATRIEME PARTIE

ETUDE DU DEVELOPPEMENT DE LA STEATOSE EN FONCTION DES CONDITIONS

D'INTOXICATION

- Chapitre Premier : Essais de tolérance générale.

- Chapitre Deuxième : Injection de doses répétées et variables.

- Chapitre Troisième: Injection d'une dose unique : étude cinétique du développement de la stéatose.

CHAPITRE PREMIER

ESSAIS DE TOLERANCE GENERALE

Les premiers problèmes toxicologiques que nous avons eus à résoudre ont été relatifs d'une part à la voie d'administration à utiliser pour l'introduction du phosphore blanc dans l'organisme du rat et, d'autre part, à la dose à administrer pour obtenir une stéatose hépatique. C'est la raison pour laquelle nous avons commencé par faire des essais rapides de tolérance générale que nous allons décrire dans le premier chapitre de cette quatrième partie.

A- PROTOCOLE

Le phosphore blanc a été administré sous forme de solution huileuse, à doses croissantes à des rats Wistar mâles. Nous avons essayé les six doses suivantes :

2,5mg/kg
5,1mg/kg
10,3mg/kg
13,5mg/kg
20,1mg/kg
24,5mg/kg

Chaque dose a été administrée à trois rats, deux la recevant par voie sous cutanée (SC) et un par voie buccale (VB). Le poids des animaux a été noté régulièrement.

Certains animaux sont morts en cours d'expérimentation. Dans le cas des survivants, les uns ont été sacrifiés après neuf jours d'intoxication,

les autres ont été laissés en vie afin d'observer des effets tardifs éventuels du toxique. Chez les rats morts ou sacrifiés, on a prélevé les foies et estimé qu'il y avait ou non une stéatose macroscopique selon la présence ou l'absence de plaques lipidiques jaunâtres tendant plus ou moins à envahir les différents lobes de l'organe.

Les foies ont été ensuite lavés et pesés et l'on a effectué après homogénéisation dans l'eau distillée une estimation approchée de la teneur en lipides totaux par la réaction phosphovanillique (345).

B- RESULTATS

1- La dose de 2,5mg/kg a été bien tolérée par les trois rats et a peu affecté leur courbe de poids. Un des deux rats ayant reçu le toxique par voie sous-cutanée et celui l'ayant reçu par voie buccale ont été sacrifiés. Leur foie avait un aspect macroscopique sensiblement normal et le rapport poids du foie en p100 (F/C) était identique : 4,1. La réaction phosphovanillique des homogénats confirme l'observation macroscopique : 21,0 (SC) et 22,2 (VB) mg de lipides totaux par gramme d'organe.

Le troisième rat qui avait reçu la dose par voie sous-cutanée a été laissé en vie et a montré un comportement général tout à fait normal.

2- La dose de 5,1mg/kg a été bien tolérée par les rats intoxiqués par voie sous-cutanée. Le rat ayant reçu cette dose par voie buccale a présenté des troubles nerveux assez constants dès le lendemain de l'administration du phosphore blanc, qui consistaient en un aspect craintif, une réaction de défense nette (cris, agitation) dès que l'on essayait de le saisir, et une réaction de fuite lors de la pesée. Cependant, la courbe de poids des trois animaux est restée sensiblement normale. Deux rats ont été sacrifiés. Leur foie ne montrait pas de modification macroscopique, ce qui est confirmé par

la réaction phosphovanillique des homogénats : 17,0 (SC) et 29,0 (VB) mg de lipides totaux par gramme d'organe. Le rapport F/C est voisin : 4,2 (SC) et 4,1 (VB).

Le troisième rat (SC), qui n'a pas été sacrifié, a perdu progressivement du poids jusqu'au quatrième jour (-13g) ; la courbe pondérale a suivi, ensuite, une évolution tout à fait normale.

3- Si l'un des deux rats injectés supporte bien la dose 10,3mg/kg il n'en est pas de même du deuxième animal et de celui ayant ingéré le toxique, qui meurent tous deux en un peu moins de trente heures après avoir montré une asthénie progressive, des troubles de la posture et de la locomotion, des troubles respiratoires (hypopnée) et une perte de poids importante (-21g pour le rat SC et -15g pour VB) ; c'est le rat ayant reçu le phosphore blanc par voie buccale qui a présenté le plus nettement ces signes d'intoxication. Par contre à l'autopsie, seul le foie du rat injecté présentait une stéatose importante ayant envahi l'ensemble de l'organe dont la teneur en lipides totaux est d'ailleurs élevée : 63,2mg/g ; le rapport F/C pour ce même animal est de 4,3. Le foie du rat ayant ingéré le toxique présentait, quant à lui, une stéatose légère ayant atteint surtout le lobe latéral gauche, le lobe caudé et le processus papillaire ; les lipides totaux sont cependant normaux (27,7mg/g) ; le rapport F/C est par contre élevé (4,6).

La courbe pondérale du troisième rat (SC) qui n'a pas été sacrifié a présenté une pente négative jusqu'au troisième jour (-11g) puis positive et tout à fait comparable à celle des rats non intoxiqués.

4- La dose 13,5mg/kg a provoqué la mort des deux rats ayant reçu le toxique par voie sous-cutanée, en moins de vingt-quatre heures après une chute pondérale de 7 et 9 grammes. A l'autopsie, un des foies présentait une stéatose d'intensité moyenne mais régulière (lipides totaux : 33,3mg/g), tandis que

le deuxième montrait une stéatose d'intensité moyenne également, mais portant surtout sur le lobe latéral gauche ; le lobe caudé et le processus papillaire (lipides totaux : 28,0mg/g). Le rapport F/C était voisin dans les deux cas : 4,7 et 4,8.

Le rat ayant reçu la dose par voie buccale a par contre, fort bien supporté le toxique et sa courbe de poids n'a pas été modifiée par l'intoxication.

5- La dose 20,1mg/kg a provoqué la mort des trois rats. Les deux rats injectés sont morts en moins de vingt-quatre heures, après avoir perdu 11 grammes. A l'autopsie, leur foie présentait une stéatose d'intensité moyenne (lipides totaux : 43,3 et 24,2mg/g). Le rapport F/C était voisin pour les deux animaux : 4,6 et 4,7.

Le rat ayant ingéré la dose a montré des troubles de la posture et de la locomotion, des troubles respiratoires (dyspnée), et est mort en un peu moins de sept jours après avoir perdu 60 grammes, la perte de poids ayant été progressive ; celle-ci est responsable en grande partie de la valeur très élevée du rapport F/C : 5,5. A l'autopsie, le foie de l'animal présentait une stéatose massive, ayant envahi tous les lobes de l'organe ; la réaction phosphovanillique confirme cette observation : 161,6mg de lipides totaux par gramme d'organe.

6- La dose de 24,5mg/kg, enfin, a également provoqué la mort de tous les animaux, en moins de vingt-quatre heures, pour les rats ayant reçu le toxique par voie sous-cutanée et en moins de vingt-quatre heures pour celui l'ayant ingéré ; la perte de poids a été relativement modérée pour les rats SC (6 et 8 grammes), mais beaucoup plus marquée pour le rat VB (19 grammes). A l'autopsie, le foie de chaque animal présentait une stéatose d'intensité

moyenne, celle du rat VB étant la plus marquée ; les lipides totaux étaient de 26,9 et 38,8mg/g pour les rats SC avec un rapport F/C de 4,9 et 4,7, et de 45,2mg/g pour le rat VB avec un rapport F/C de 4,3.

C- DISCUSSION

Ces essais de tolérance générale ont eu pour but d'envisager l'abord d'une question essentielle : quelles sont les conditions d'intoxication optimales-doses efficaces - voie d'administration pour effectuer une étude de l'action du phosphore blanc chez le rat ? Il semble que l'on puisse en dégager les enseignements suivants :

1- Effets de la dose administrée

Les doses 2,5 et 5,1mg/kg ont été assez bien tolérées. Le fait que la teneur des foies en lipides soient restée normale n'implique pas qu'il n'y ait pas eu de stéatose, car le délai tardif du sacrifice (9 jours) a peut être permis sa régression. Nous verrons, d'autre part, que le taux des lipides est insuffisant pour définir biochimiquement la stéatose hépatique.

C'est à partir de 10,3mg/kg que l'on observe une mortalité notable, atteignant deux animaux sur trois ; la voie d'administration ne semble jouer qu'un faible rôle. Un des rats ayant reçu cette dernière dose par voie sous-cutanée a présenté une stéatose macroscopique confirmée par l'analyse biochimique.

Lorsque l'on atteint la dose de 20,1mg/kg, la mortalité devient générale et frappe en moins de vingt-quatre heures tous les animaux ayant reçu le toxique par voie sous-cutanée ; l'ingestion provoque une mort plus tardive (sept jours avec 20,1mg/kg, vingt neuf heures avec 24,5mg/kg).

2- Effets de la voie d'administration

Au cours de ces essais, nous nous sommes rendus compte que l'utilisation régulière de la voie buccale chez le rat nécessiterait une légère anesthésie à l'éther en raison de la difficulté du tubage qui constitue, en lui-même, un inconvénient supplémentaire ; c'est ce qui a été réalisé, d'ailleurs, par les auteurs qui ont fait appel à cette voie (258, 352, 176).

Mais ceci nous paraît constituer un inconvénient assez grave lorsque, dans certaines expérimentations, l'on souhaite mesurer des paramètres biologiques aussi fluctuants que les acides gras non estérifiés ou le glycérol plasmatiques.

On notera, en outre, que l'intoxication par voie sous-cutanée provoque une augmentation du rapport F/C sensiblement proportionnelle à la dose de phosphore administrée (4,1 pour 2,5mg/kg ; 4,2 pour 5,1mg/kg ; 4,3 pour 10,3mg/kg ; 4,75 pour 13,5mg/kg ; 4,65 pour 20,1mg/kg et 4,8 pour 24,5mg/kg). La variation de ce rapport, qui nous le verrons ultérieurement présente un grand intérêt, est par contre beaucoup plus irrégulière lors de l'administration orale.

D'autre part, les fortes surcharges en lipides hépatiques ont été obtenues, per os, avec des doses qui paraissent atteindre voire dépasser la dose létale 100. Cette constatation hypothèque également l'usage de cette voie pour l'intoxication.

Mais surtout, l'utilisation de la voie orale risque d'entraîner des lésions digestives en raison de l'action caustique du phosphore blanc . Ces altérations pourraient aggraver inégalement la toxicité d'un animal à l'autre. Dans une étude métabolique relativement poussée de l'action d'un toxique, telle que celle que nous nous proposons d'effectuer, il est certainement peu souhaitable que des perturbations locales puissent venir

modifier l'action propre que l'on cherche à évaluer.

Dans le même esprit la voie intra-péritonéale n'a pas été essayée car on pouvait craindre qu'elle ne provoque une altération directe du foie par le toxique (332).

*

* *

Que conclure de ces remarques ?

- Tout d'abord que la voie sous-cutanée mérite d'être préférentiellement retenue.
- Ensuite, que l'effet des différentes doses essayées nous conduit à envisager deux types d'expérimentation :
 - Une première série doit permettre d'étudier l'influence globale de l'intoxication phosphorée sur l'économie générale de l'organisme animal, en suivant par exemple les courbes de croissance pondérale des animaux traités. Il n'est pas possible, en effet, d'isoler l'étude de la stéatose hépatique du contexte général de l'action du toxique la déclenchant.

Il est évident que de tels essais doivent être réalisés avec des doses relativement bien tolérées (même si leur pouvoir stéatogène ne paraît pas très net), quitte à les répéter, afin de suivre le comportement des animaux pendant un temps plus long. Nous avons donc retenu, dans une telle perspective, les doses de 2,5mg/kg et de 5mg/kg, comparables du reste à celles utilisées par DIANZANI (125, 127, 129).

- Une seconde série doit permettre de provoquer avec certitude la stéatose chez les rats traités, afin de déterminer avec précision le délai de son apparition, de suivre son évolution et surtout d'étudier les éventuelles modifications biologiques qui la précèdent ou l'accompagnent. Dans ce but

l'administration de doses plus élevées de toxique, en une injection unique plus commode à pratiquer, peut être retenue. On devra néanmoins accepter le risque d'une mortalité non négligeable. On a donc choisi pour ces essais une dose de l'ordre de 10mg/kg, voisine de celle utilisée dans des conditions comparables par OPIE & ALFORD (296, 297) et DIANZANI (125).

Nous exposerons donc dans les chapitres suivants l'action d'injections répétées de Phosphore blanc chez le rat, puis l'action de l'injection d'une dose unique plus forte de ce même toxique.

CHAPITRE DEUXIEME

INJECTION DE DOSES REPETEES ET VARIABLES

L'étude de l'injection de doses répétées et variables de phosphore blanc à des rats a fait l'objet d'une communication à l'Académie de Pharmacie (380).

I - PROTOCOLE

Les épreuves de tolérance générale ont permis de fixer deux doses différentes :

- une dose de 2,5mg/kg administrée dix fois au rythme d'une injection sous-cutanée tous les deux ou trois jours ce qui représente une quantité totale de 25mg/kg,
- une dose de 5mg/kg répétée deux fois soit une quantité totale de 15mg/kg.

Chacune de ces deux doses est administrée à quinze rats ; dix rats servent de témoins pour chaque essai. Les animaux sont nourris "ad libitum". Leur poids est mesuré régulièrement pendant ces expérimentations.

Une certaine mortalité a été relevée sous l'action du toxique :

- la dose 2,5mg/kg a provoqué la mort de trois animaux, deux jours après la neuvième injection, soit vingt-cinq jours après le début de l'intoxication

- la dose 5mg/kg a provoqué la mort de quatre animaux après la deuxième injection et de quatre autres après la troisième, soit respectivement cinq et sept jours après le début de l'intoxication. C'est cette mortalité élevée qui nous a empêché, dans ce dernier cas, d'administrer une quantité totale de phosphore équivalente à celle reçue par les rats soumis à 2,5mg/kg.

Les rats survivants ont été sacrifiés deux jours après la dernière injection, soit respectivement pour chaque série vingt-huit jours et huit jours après le début de l'intoxication.

Foies et sang sont recueillis ; les foies présentant un aspect macroscopique identique sont, après pesée, réunis par deux ou trois afin de préparer une pulpe commune ; ce mode opératoire permet de diminuer le délai d'analyse des enzymes et limite par conséquent les risques de variation de leur activité au cours du temps. Les sérums des mêmes animaux sont également mélangés.

On effectue un bilan lipidique complet sur les sérums et les foies et, seulement sur ces derniers, un bilan enzymatique.

II- RESULTATS

Les différents résultats sont portés dans le tableau 1 pour la dose 2,5mg/kg et dans le tableau 2 pour la dose 5mg/kg.

A- ACTION SUR L'EVOLUTION DU POIDS CORPOREL

L'injection de phosphore blanc provoque des variations pondérales particulièrement nettes, qui sont illustrées par la figure VI. La perte de poids par rapport aux animaux témoins devient significative ($p < 0,01$) dès le sixième jour d'intoxication chez les rats recevant 2,5mg/kg (I_1) et dès le cinquième jour ($p < 0,001$) chez ceux recevant 5mg/kg (I_2). Durant la même période, l'augmentation pondérale des animaux témoins, par rapport à leur poids initial, est également très significative ($p < 0,01$ et 0,001 respectivement).

B- ACTION SUR LE POIDS DES FOIES

a- La dose 2,5mg/kg provoque une diminution très significative du poids des foies des animaux intoxiqués par rapport aux témoins et une baisse simultanée du poids du corps.

Cette double évolution a pour effet de maintenir constant le rapport F/C ($\frac{\text{poids du foie en p100}}{\text{poids du corps}}$). L'aspect de ces organes à l'examen anatomique est sensiblement normal.

b- La dose 5mg/kg ne provoque pas par contre de variation pondérale des foies par rapport aux témoins ; néanmoins, la chute du poids corporel persiste et est responsable de l'augmentation significative du rapport F/C . On observe, à l'autopsie, une stéatose macroscopique d'intensité très variable.

C- ACTION BIOCHIMIQUE SUR LE TISSU HEPATIQUE

1- Lipides

a- La dose 2,5mg/kg ne détermine pas de variations des lipides totaux et du cholestérol total mais provoque, par contre, une augmentation du taux des triglycérides et une diminution des phospholipides qui sont significatives.

L'évolution inverse de ces deux derniers paramètres doit contribuer à cette stabilité de la teneur en substances lipidiques globales.

Ces résultats sont confirmés par l'analyse chromatographique qui met en évidence une augmentation marquée des triglycérides, plus discrète des esters du cholestérol ; certains foies montrent en outre une légère augmentation des mono et diglycérides. Les fractions phospholipidiques paraissent également modifiées : les lécithines, les inositolphosphatides et les céphalines du groupe phosphatidyléthanolamine sont légèrement diminués alors que les lysolécithines semblent en augmentation.

b- La dose 5mg/kg fournit des résultats plus variables selon les animaux ; c'est ainsi que l'on a observé :

- une stéatose massive chez un seul des rats sacrifiés et chez un rat mort en cours d'expérimentation ; elle est caractérisée par une très forte élévation du taux des lipides totaux et des triglycérides ; les résultats du rat sacrifié présentant une stéatose massive sont indiqués à part dans le tableau 2.
- une stéatose modérée chez les six autres animaux sacrifiés, qui s'accompagne d'une augmentation très significative des triglycérides vraisemblablement responsable de la légère augmentation des lipides totaux ; celle-ci n'est pas significative en raison sans doute de la diminution des phospholipides;

- une stéatose intermédiaire chez les autres rats morts en cours d'expérimentation. Les lipides totaux et les triglycérides sont toujours élevés ; les résultats relatifs à ces animaux ne sont pas portés dans le tableau 2 en raison du caractère variable du délai entre le début de l'intoxication et la mort.

Tous ces résultats sont confirmés par l'analyse chromatographique qui objective l'augmentation prépondérante des triglycérides, l'élévation discrète des esters du cholestérol et des diglycérides, et une légère diminution du cholestérol libre et des phospholipides.

2- Enzymes

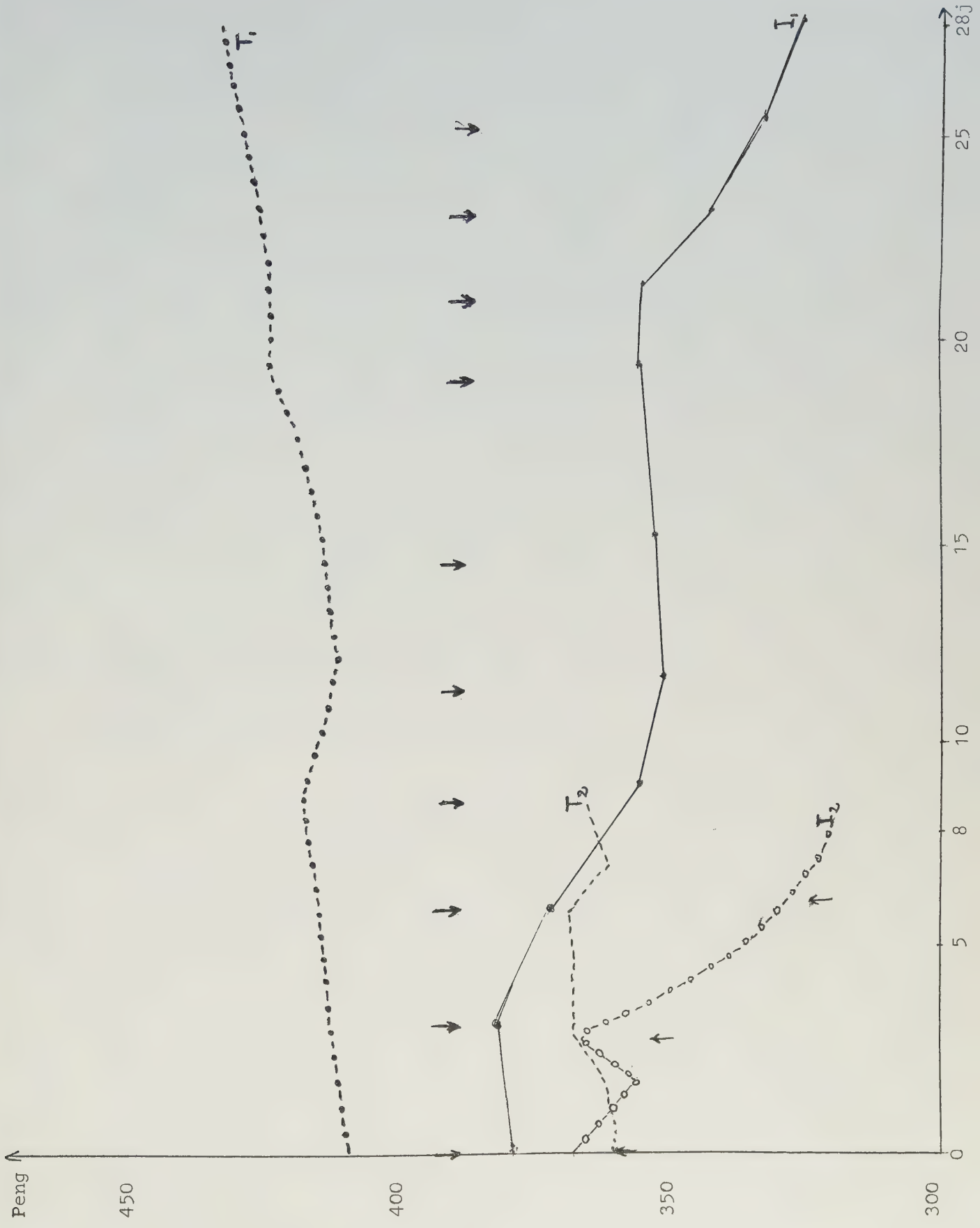
L'effet des deux doses est assez comparable : l'activité de la glucose-6-phosphate déshydrogénase et de la lacticodéshydrogénase ne montre pas de variation significative. En revanche une diminution nettement plus marquée avec 2,5mg/kg qu'avec 5mg/kg est observée pour l'aldolase. La seule différence entre les deux séries d'essais est trouvée pour l'activité de la malicodéshydrogénase qui est significativement diminuée chez les rats ayant reçu 2,5mg/kg, mais qui n'est pas modifiée pour 5mg/kg. Remarquons enfin, que l'activité des enzymes du foie du rat présentant une stéatose massive est abaissée, exception faite de la glucose-6phosphate déshydrogénase.

D- ACTION BIOCHIMIQUE SUR LES LIPIDES SÉRIQUES

- La dose de 2,5mg/kg provoque une chute faible mais significative de la lipémie des rats et une diminution très importante, de plus de 50p100, de la triglycéridémie.
- La dose de 5mg/kg ne modifie significativement que le cholestérol total qui est augmenté.

Figure VI

Action du phosphore blanc sur la croissance du rat.



	Foie (g)	F/C en %	Lipides hépatiques(mg/g)				Enzymes hépatiques (UI/g protéines)				Lipides sériques (g/l)			
			L.T.	TG.	C.T.	PL.	G6PD	LDH	MDH	ALD	L.T.	TG.	C.T.	PL.
Témoins	m	3,05	31,25	3,75	1,98	22,28	11,80	630	1852	13,80	2,88	1,38	0,66	0,69
	s	0,15	2,15	0,66	0,43	1,35	3,60	183	68	1,32	0,28	0,19	0,14	0,16
Intoxiqués	m	3,06	30,46	9,80	2,06	16,24	11,13	500	1288	6,00	2,50	0,64	0,70	0,82
	s	0,31	4,28	3,68	0,22	3,21	1,77	84	129	0,92	0,13	0,10	0,08	0,12
Valeur de p	<0,001	N.S.	N.S.	<0,02	N.S.	# 0,01	N.S.	N.S.	<0,01	<0,02	<0,05	<0,001	N.S.	N.S.

TABEAU 1

Effets de l'injection répétée de 2,5mg de phosphore blanc/kg (25 mg/kg au total) chez le rat

	Foie (g)	F/C en %	Lipides hépatiques (mg/l)				Enzymes hépatiques (UI/g protéines)				Lipides sériques (g/l)			
			L.T.	TG.	PL.		G6PD	LDH	MDH	ALD	L.T.	TG.	C.T.	PL.
Témoins	m	3,06	29,04	2,70	24,53		11,80	790	1492	13,80	2,68	0,91	0,66	0,82
	s	0,30	7,54	1,13	3,90		3,61	94	102	1,32	0,41	0,27	0,08	0,23
Intoxiqués modérément stéatosés	m	3,48	36,93	12,70	20,30		10,43	976	1396	11,39	3,06	0,82	0,91	1,00
	s	0,39	4,27	1,73	2,08		0,92	137	126	0,65	0,42	0,19	0,13	0,32
Valeur de p	N.S.	<0,05	N.S.	<0,001	N.S.		N.S.	N.S.	N.S.	<0,05	N.S.	N.S.	<0,05	N.S.
Rat très stéatosé	13,4	4,38	109,7	73,34	20,24		10,02	364	710	7,99	-	-	-	-

TABEAU 2

Effets de l'injection répétée de 5 mg de Phosphore Blanc/kg (15mg/kg au total) chez le rat.

III- DISCUSSION

A- ACTION SUR L'EVOLUTION DU POIDS CORPOREL

L'action du phosphore blanc sur les courbes de croissance des animaux intoxiqués est nette pour les deux doses administrées et semble proportionnelle à la quantité unitaire injectée ; cet effet prouve l'atteinte générale des processus métaboliques au sein des organismes subissant l'agression toxique. Cette importante constatation pose le problème de l'origine de la perte de poids observée. On peut l'attribuer, outre à une certaine anorexie, soit à une altération profonde de l'anabolisme protidique, soit à une fonte du tissu adipeux de réserve s'accompagnant d'une mobilisation accrue des acides gras vers le foie qui expliquerait directement la surcharge hépatique en triglycérides, les deux phénomènes pouvant fort bien d'ailleurs coexister. Nous aurons l'occasion de revenir de façon plus approfondie sur ce point au cours de nos expérimentations.

B- ACTION SUR LE POIDS DU FOIE

L'effet semble différent selon la dose injectée, la diminution du poids des foies mise en évidence avec 2,5mg/kg n'étant pas retrouvée avec 5mg/kg. On notera des différences dans les poids des foies des animaux témoins ; elles sont liées à des variations du poids corporel. Par contre, le rapport F/C n'est pas affecté par ces inégalités relatives : il est identique pour les deux séries de témoins ce qui démontre toute sa valeur.

Ainsi, la comparaison du poids des foies des rats intoxiqués par les deux doses montre l'absence de variation significative en valeur absolue ; il n'en est pas de même du rapport F/C qui est plus élevé ($p < 0,02$) pour les rats soumis à 5mg/kg que pour ceux ayant reçu 2,5mg/kg. Cette augmentation est due uniquement à l'effet sur la courbe de croissance qui est beaucoup plus nette avec la dose 5mg/kg qu'avec celle de 2,5mg/kg.

C- ACTION BIOCHIMIQUE SUR LE TISSU HEPATIQUE

1- Lipides

Le phénomène le plus remarquable réside dans l'évolution de la répartition des diverses classes de lipides même lorsque la valeur globale de ces derniers ne varie pas. L'augmentation des triglycérides, notamment, est générale ; la stéatose provoquée par le phosphore blanc est donc bien une stéatose vraie avec accumulation de triglycérides.

Par contre l'apport en phosphore ne stimule en rien la formation de phospholipides. Ceci n'est pas surprenant, car toutes les stéatoses toxiques ou médicamenteuses se traduisent essentiellement par une accumulation de glycérides. Il serait simpliste de voir dans l'injection de phosphore blanc la cause d'une stimulation de la biosynthèse endogène de phospholipides. Celle-ci semble même être plutôt diminuée lors de l'administration répétée de ce toxique, l'effet étant plus marqué avec 2,5mg/kg.

Ainsi, une quantité totale plus élevée fractionnée en doses unitaires plus faibles (essai 2,5mg/kg) semble exercer une action moins nette sur les triglycérides mais un peu plus marquée sur les phospholipides qu'une quantité totale moins élevée fractionnée en doses unitaires plus grandes (essai 5mg/kg).

Ceci semble indiquer que c'est davantage l'importance de la dose de phosphore administrée que sa répétition qui est importante pour provoquer la formation de la stéatose hépatique. Cette remarque rejoint les conclusions que nous avons tirées après les essais de tolérance générale.

2- Enzymes

L'action du phosphore blanc sur les quatre enzymes étudiées est faible. Seule l'activité de l'aldolase est diminuée de façon significative, plus nettement avec 2,5mg/kg. Dans ce dernier essai la diminution significative de l'activité de la malicodéshydrogénase paraît assez artificielle dans la mesure où celle-ci semble déjà variable dans les deux lots témoins (2,5mg/kg et 5mg/kg).

Le fait que l'activité de la glucose-6-phosphate déshydrogénase reste constante lors de l'intoxication peut indiquer que la stéatose hépatique provoquée par le phosphore blanc n'est pas due à une augmentation de la synthèse "in situ" des triglycérides. En effet nous avons déjà signalé que cette enzyme est la principale responsable de la production de NADPH indispensable pour la biosynthèse des acides gras et, par suite, des triglycérides. La diminution de l'aldolase qui permet la production de la phosphodihydroxyacétone, précurseur du glycérol, renforce également cette hypothèse.

D- ACTION BIOCHIMIQUE SUR LES LIPIDES SÉRIQUES

On relève des discordances selon la quantité de toxique administrée. Outre l'éventualité d'un "effet-dose", on peut imaginer que la durée d'intoxication, des facteurs extra-hépatiques, etc...., interviennent.

Néanmoins, la diminution des triglycérides est observée de façon constante mais inégale au cours des deux essais ; la signification élevée de celle-ci à 2,5mg/kg pourrait cependant être en rapport avec le niveau relativement élevé de la triglycérémie des témoins (1,38g/l). Cette tendance va tout à fait dans le sens des observations antérieures de LOMBARDI & RECKNAGEL (258) au cours d'expérimentations menées différemment.

D'autre part, les rats intoxiqués par 5mg/kg ont des teneurs en lipides totaux et en cholestérol total plus élevées, significativement ($p < 0,05$) que ceux ayant reçu 2,5mg/kg. Bien que ces variations soient assez faibles, on peut penser qu'elles sont la conséquence d'un processus rétentionnel, de même que la tendance à l'augmentation des phospholipides.

De toute façon, les modifications des divers lipides circulants paraissent peu représentatives de la gravité des altérations du parenchyme hépatique dans les conditions d'intoxication utilisées ici.

*
* *

En conclusion l'administration répétée de phosphore blanc par voie sous-cutanée, à des doses provoquant des intoxications aiguës et subaiguës chez le rat, exerce une action inhibitrice sur la croissance et provoque une augmentation constante de la teneur des foies en triglycérides, c'est-à-dire la stéatose hépatique. Pour en étudier le développement, il est nécessaire de pratiquer une injection unique de doses plus élevées du toxique, ce qui permettra également de mieux apprécier l'action de celui-ci sur le foie du rat, tout en limitant les variations du poids corporel des animaux en expérience.

C'est cette étude de l'action d'une dose unique de phosphore blanc que nous allons envisager dans le troisième chapitre.

CHAPITRE TROISIEME

INJECTION D' UNE DOSE UNIQUE

ETUDE CINETIQUE DU DEVELOPPEMENT DE LA STEATOSE

Les essais de tolérance générale nous ont permis de conclure qu'il conviendrait d'utiliser une dose de Phosphore blanc de l'ordre de 10mg/kg pour étudier le développement de la stéatose hépatique. Rappelons que, sur les deux rats qui avaient reçu la dose 10,3mg/kg, un seul avait survécu ; le second était mort 30 heures après l'injection et son foie présentait une stéatose macroscopique importante.

Afin de mieux définir les conditions d'intoxication par administration d'une dose unique (dose à utiliser, durée d'intoxication), nous avons effectué deux expériences préliminaires que nous allons, tout d'abord, décrire.

I- EXPERIENCES PRELIMINAIRES

A- PROTOCOLE

Injection par la voie sous-cutanée des deux doses suivantes :

7,5mg/kg

10mg/kg

chacune étant administrée à deux rats.

Les animaux sont sacrifiés au bout d'un temps naturellement inférieur à celui (30 heures) pour lequel nous avons observé une stéatose lors des essais de tolérance générale, soit 12 heures. Deux rats servent

de témoins pour la dose 7,5mg/kg et un seul pour la dose 10mg/kg.
Tous les animaux sont nourris "ad libitum".

Sur les foies et les sérums est effectué un bilan lipidique.

B- RESULTATS

Les différents résultats obtenus sont portés dans le tableau 3 pour la dose 7,5mg/kg et dans le tableau 4 pour la dose 10mg/kg.

1- Dose 7,5mg/kg

- a- Cette dose n'a exercé chez un des deux rats intoxiqués (n°1) que peu d'effet sur le poids du foie, le rapport F/C et les diverses fractions lipidiques hépatiques, à l'exception des triglycérides; néanmoins elle semble avoir provoqué une diminution marquée des lipides sériques, aussi bien leur concentration globale que celle des différentes fractions.
- b- Chez l'autre rat (n° 2) on observe, par contre, un poids du foie et un rapport F/C augmentés. Ceci est accompagné par une diminution assez nette des lipides totaux, et des phospholipides ; le cholestérol et les triglycérides sont peu modifiés. Au niveau sanguin, on note surtout une diminution des triglycérides.

En conclusion de ce premier essai préliminaire, nous pouvons estimer que la dose 7,5mg/kg exerce une action inconstante sur le poids du foie et le rapport F/C mais qui semble aller dans le sens de leur augmentation. Elle tend, d'autre part, à diminuer les phospholipides hépatiques et, par suite, les lipides totaux, car elle influence peu

les triglycérides et le cholestérol total. Au niveau sanguin, elle semble provoquer surtout une diminution des triglycérides, mais peut-être celle-ci est-elle due au fait que la valeur de la triglycémie des témoins est relativement élevée.

L'action de cette dose de 7,5mg/kg étant peu nette, nous avons effectué un second essai préliminaire en augmentant la dose injectée.

2- Dose 10mg/kg

- a- Chez l'un des deux rats intoxiqués (n° 1), on note les mêmes tendances au niveau du foie que celles observées lors de l'essai précédent, à savoir : une augmentation du poids du foie et du rapport F/C, une légère diminution des différentes classes de lipides. Au niveau sanguin, on constate une diminution des lipides portant surtout sur les triglycérides.
- b- Chez l'autre animal (n° 2), peu de crédit semble devoir être accordé aux variations légères du poids du foie et du rapport F/C ; on relève, par contre, une augmentation des triglycérides hépatiques assez comparable à celle trouvée lors de l'essai de répétition de la dose 2,5mg/kg (cf. tableau 1), et qui paraît compenser largement la diminution des phospholipides puisque les lipides totaux sont légèrement augmentés ; le cholestérol est, quant à lui, diminué. Au niveau sérique, la diminution des lipides totaux et surtout des triglycérides est plus marquée que pour le premier rat et est accompagnée par une faible baisse des phospholipides. Il nous faut cependant remarquer que, comme dans l'essai précédent, la valeur de la triglycémie des animaux témoins paraît élevée.

	Foie (g)	F/C en %	Lipides hépatiques (mg/g)				Lipides sériques (g/l)			
			L. T.	TG.	C. T.	PL.	L. T.	TG.	C. T.	PL.
Témoins (m)	14,1	3,12	37,8	5,91	2,88	24,6	5,00	2,21	0,73	2,01
Intoxiqué n°1	14,0	3,27	34,5	3,43	2,79	23,2	2,85	1,08	0,40	1,07
Intoxiqué n°2	15,6	3,67	25,9	5,17	2,50	17,3	4,35	1,12	0,75	2,25

TABLEAU 3

Action du Phosphore blanc chez le rat (7,5mg/kg en S.C. après 12 heures)

	Foie (g)	F/C en %	Lipides hépatiques (mg/g)				Lipides sériques (g/l)			
			L. T.	TG.	C. T.	PL.	L. T.	TG.	C. T.	PL.
Témoin	12,1	3,22	34,8	4,91	2,85	24,6	3,40	1,74	0,54	1,18
Intoxiqué n°1	14,7	3,62	30,8	3,98	2,22	21,6	2,30	0,60	0,50	1,10
Intoxiqué n°2	11,3	3,43	36,3	9,96	2,11	20,7	1,60	0,32	0,52	0,79

TABLEAU 4

Action du Phosphore blanc chez le rat (10 mg/kg en S.C. après 12 heures)

C- DISCUSSION

Au cours de ce second essai préliminaire, nous avons donc pu observer l'apparition d'un signe biochimique majeur de l'installation de la stéatose hépatique : l'augmentation des triglycérides. Bien que celle-ci n'ait pas été très importante et n'ait été enregistrée que chez un des deux animaux ayant reçu la dose 10mg/kg, on peut admettre que cette dernière doit être sûrement stéatogène, mais au bout d'un délai plus important.

C'est la raison pour laquelle nous avons décidé d'augmenter non pas la dose, ce qui risquerait d'entraîner une mortalité trop grande, mais le délai avant le sacrifice afin de mieux mettre en évidence le développement de la stéatose hépatique.

Cependant, il est un second point important que nous voudrions discuter, c'est celui ayant trait à l'état métabolique des animaux au moment du sacrifice. Lors des essais de répétition de doses, nous voulions étudier le retentissement de l'intoxication phosphorée sur l'organisme du rat et nous avons, naturellement, laissé les animaux se nourrir "ad libitum" tout au long de l'expérimentation et, en particulier, avant le sacrifice. Nous avons agi de même au cours de ces deux essais préliminaires afin de conserver un élément de comparaison. Par contre, deux arguments plaident en faveur du maintien à jeûn des animaux pendant un délai suffisant avant le sacrifice :

- d'une part, le jeûne provoque l'épuisement des réserves glycogéniques hépatiques qui sont sans doute plus importantes chez les témoins que chez les intoxiqués (329, 287) ; dans ce cas le poids des foies relevé serait alors plus significatif de la composition "actuelle" du foie, reflet de l'activité métabolique "nette" que l'on peut opposer à l'activité métabolique "brute" des animaux non à jeûn;

- d'autre part, c'est seulement chez des animaux à jeun que l'on peut interpréter valablement les variations des lipides sériques et, notamment, des triglycérides.

Aussi, pour toutes les intoxications réalisées avec cette dose unique de 10mg de phosphore blanc par kilogramme de poids corporel, nous avons procédé au sacrifice des animaux après une période jeûne de l'ordre de dix huit heures, en particulier pour l'étude cinétique du développement de la stéatose que nous allons décrire maintenant.

II- ETUDE CINETIQUE DU DEVELOPPEMENT DE LA STEATOSE PHOSPHOREE

A- PROTOCOLE

Pour réaliser cette étude cinétique, nous avons à résoudre deux problèmes pratiques :

- d'une part, effectuer la préparation des homogénats de foie et la détermination de l'activité des enzymes hépatiques dans un délai compatible avec la stabilité de celles-ci, ce qui ne pouvait être réalisé qu'à condition de ne pas avoir un nombre trop grand d'animaux en expérience en même temps ;
- d'autre part, mieux apprécier les variations individuelles et pratiquer une interprétation statistique des résultats, ce qui impliquait l'étude d'un nombre d'animaux suffisant.

Afin de répondre de façon acceptable à ces deux impératifs contradictoires, nous avons donc procédé, lors de chaque expérimentation, à l'intoxication d'au moins cinq rats et utilisé un nombre limité de témoins à chaque fois :

trois pour chacun des deux premiers essais (sur 18 et 24 heures),
deux pour chacun des deux suivants (sur 36 et 48 heures),
un pour chacun des deux derniers (sur 72 et 96 heures).

Naturellement, pour l'interprétation statistique des résultats, nous avons cumulé les données de ces douze animaux témoins, puisqu'ils ont été tous sacrifiés après une durée de jeûne identique (18 heures) et à la même période du nycthémère.

Le protocole final est donc le suivant : on injecte, par la voie sous-cutanée, du phosphore blanc en solution huileuse à la dose de 10mg/kg. Les durées successives d'intoxication sont de :

18 heures,
24 heures,
36 heures,
48 heures,
72 heures,
96 heures.

Cinq rats ont reçu le toxique à chacune des trois premières expériences. Lors de la troisième (36 heures) une mortalité importante (40p100) s'étant manifestée, nous avons porté le nombre d'animaux intoxiqués pour la quatrième (48 heures) à huit afin de disposer d'un nombre acceptable de survivants - six, en fait, demeurèrent en vie -. Les intoxications relativement prolongées (72 et 96 heures) ont été commencées simultanément en injectant le phosphore à dix rats. A la 72ème heure, il ne restait que quatre survivants, deux ont été alors sacrifiés, les deux derniers ne l'étant qu'à la 96ème heure.

Les rats intoxiqués et les témoins sont sacrifiés après un jeûne de 18 heures portant uniquement sur la nourriture solide.

Sur les foies et les sérums est réalisé un bilan lipidique. Sur les foies sont déterminées, de plus, les quatre activités enzymatiques déjà mesurées lors des essais de répétition de doses.

B- RESULTATS

Si jusqu'à la 48 ème heure nous avons pu déterminer la moyenne numérique des valeurs individuelles, les écarts-types et la signification de la différence entre les témoins et les intoxiqués, pour les 72ème et 96ème heures nous n'avons indiqué dans les différents tableaux de résultats que les moyennes, en raison du trop faible nombre d'animaux (deux) ayant survécu à chacun de ces deux temps.

1- Tolérance générale en fonction de la durée d'exposition

Sur les 33 rats ayant reçu, par voie sous-cutanée, cette dose de phosphore blanc de 10mg/kg, nous avons enregistré le nombre de morts suivants :

- deux en moins de 24 heures,
- sept entre 24 et 48 heures, dont deux certainement avant la 36ème heure,
- un entre les 48ème et 72ème heures.

L'action sur le poids corporel des animaux survivants est plus difficile à apprécier dans la mesure où nous procédons à leur sacrifice après une période de jeûne de 18 heures qui détermine naturellement, chez tous les animaux en expérience (témoins compris), une diminution de ce poids.

On peut remarquer, néanmoins, qu'il n'y a pas de différence de cette variation de poids consécutive au jeûne chez les témoins et chez les

lés intoxiqués jusqu'à la 48 ème heure ; au delà, la perte pondérale est beaucoup plus marquée chez les rats ayant reçu le toxique.

2- Action sur le poids du foie (Tableaux 5a et 5b)

Le poids des foies est augmenté de façon très significative dès la 18ème heure ; il croît encore de façon nette entre 18 et 24 heures. On observe ensuite un palier entre 24 et 48 heures, puis une augmentation légère à la 72ème heure où il paraît atteindre sa valeur maximale. Une évolution semblable est constatée pour le rapport F/C ; cependant, à partir de la 72ème heure vient se superposer une variation plus importante du poids corporel qui a pour conséquence d'amplifier la variation de ce rapport.

A l'autopsie, l'aspect macroscopique des foies des animaux intoxiqués est sensiblement normal à la 18ème heure excepté pour l'un deux qui présente une stéatose légère ; à partir de la 24ème heure, la stéatose est assez marquée pour tous les organes, mais d'intensité variable. Au delà, elle devient de plus en plus importante.

3- Action sur les lipides hépatiques

Les résultats sont indiqués dans les tableaux 5a et 5b pour les animaux sacrifiés et dans le tableau 6 pour les rats morts en cours d'expérience.

Nous les exprimons en concentration par unité de poids de tissu ("concentration"), et en valeur totale pour l'organe ("teneur totale").

a- Lipides totaux

A la 18ème heure, leur concentration est pratiquement identique à celle des témoins, mais leur teneur totale est, par contre, augmentée de façon très significative par suite de l'augmentation du

	Foie (g)	F/C p 100	Lipides Hépatiques						
			Lipides Totaux		Triglycérides		Cholestérol Total		Phospholipides
			mg/g	mg/foie	mg/g	mg/foie	mg/g	mg/foie	
Témoins	m	10,8	47,8	512	9,17	99,8	3,06	32,7	30,1
	s	1,2	4,3	55	3,68	44,5	0,53	5,0	3,8
18 heures	m	13,9	47,1	658	19,5	273	2,34	32,7	24,6
	s	0,5	4,1	77	5,1	78	0,16	2,6	1,6
	p	<0,001	N.S.	<0,001	<0,001	<0,001	<0,02	N.S.	<0,01
24 heures	m	15,4	85,2	1312	37,5	576	3,22	49,7	33,1
	s	0,7	11,5	167	6,2	82	0,29	4,6	2,6
	p	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	N.S.	<0,001	N.S.

TABLEAU 5a

Action du phosphore blanc (10 mg/kg en S.C.) sur le poids du foie et les lipides hépatiques du rat.

poids des foies.

A partir de la 24ème heure, et jusqu'au terme de cette expérience (96 heures), la concentration en lipides est de plus en plus élevée, toujours très significativement. Les variations sont encore amplifiées si l'on rapporte les résultats au foie entier.

La figure VII illustre l'ascension particulièrement rapide des lipides totaux entre la 18ème heure et la 24ème heure, la pente est encore assez marquée entre 24 et 48 heures, elle l'est beaucoup moins ensuite.

b- Triglycérides

Les triglycérides, à la différence des lipides totaux, sont augmentés de façon très significative dès la 18ème heure, aussi bien en concentration qu'en teneur totale. Il faut cependant noter une certaine variabilité : c'est ainsi que l'augmentation est très nette (multipliée par trois) chez un rat ; nette (multipliée par deux) chez un deuxième rat, modérée (multipliée par 1,5) chez les trois autres.

L'augmentation des triglycérides est, comme celle des lipides totaux, extrêmement rapide entre les 18ème et 24ème heures ; elle ralentit à partir de la 36ème heure, la pente étant assez régulière jusqu'à la 96ème heure. La figure VII illustre bien cette évolution.

L'analyse chromatographique confirme, d'autre part, cette augmentation de plus en plus importante des triglycérides.

c- Cholestérol total

La variation du cholestérol total est beaucoup moins spectaculaire et constante que celle des triglycérides.

C'est ainsi qu'à la 18ème heure on observe une diminution significative de sa concentration, mais sa teneur totale est identique à celle des témoins. A la 24ème heure, la concentration est sensiblement normale mais la teneur totale est augmentée très significativement. Cette dernière va continuer à croître jusqu'à la 36ème heure ; elle redescend ensuite jusqu'à la 72ème heure, mais en restant toujours supérieure à celle des témoins, et enfin elle remonte à la 96ème heure. La concentration suit une évolution parallèle.

d- Phospholipides

Les phospholipides varient, également, de façon très inconstante. Jusqu'à la 36ème heure, leur évolution est tout à fait comparable à celle du cholestérol total : concentration abaissée significativement et teneur totale sensiblement normale à la 18ème heure, puis concentration voisine de celle des témoins et teneur totale augmentée significativement à la 24ème heure et à la 36ème heure. Si l'on note ensuite, une augmentation très significative à la concentration après 48 heures, elle disparaît au bout de 72 heures pour faire place finalement (96ème heure) à une diminution; la quantité de phospholipides dans l'organe entier est, néanmoins, toujours supérieure à celle des témoins.

Ce sont ces variations irrégulières des phospholipides qui permettent d'expliquer le fait que les courbes des lipides totaux et des triglycérides n'aient pas des pentes identiques à partir de la 24ème heure, celle des lipides totaux étant beaucoup moins régulière (figure VII)

Ainsi, l'action du phosphore blanc sur les lipides hépatiques se traduit par une augmentation des triglycérides apparaissant dès la 18ème heure et qui est exclusivement responsable de l'augmentation des lipides totaux observée à partir de la 24ème heure.

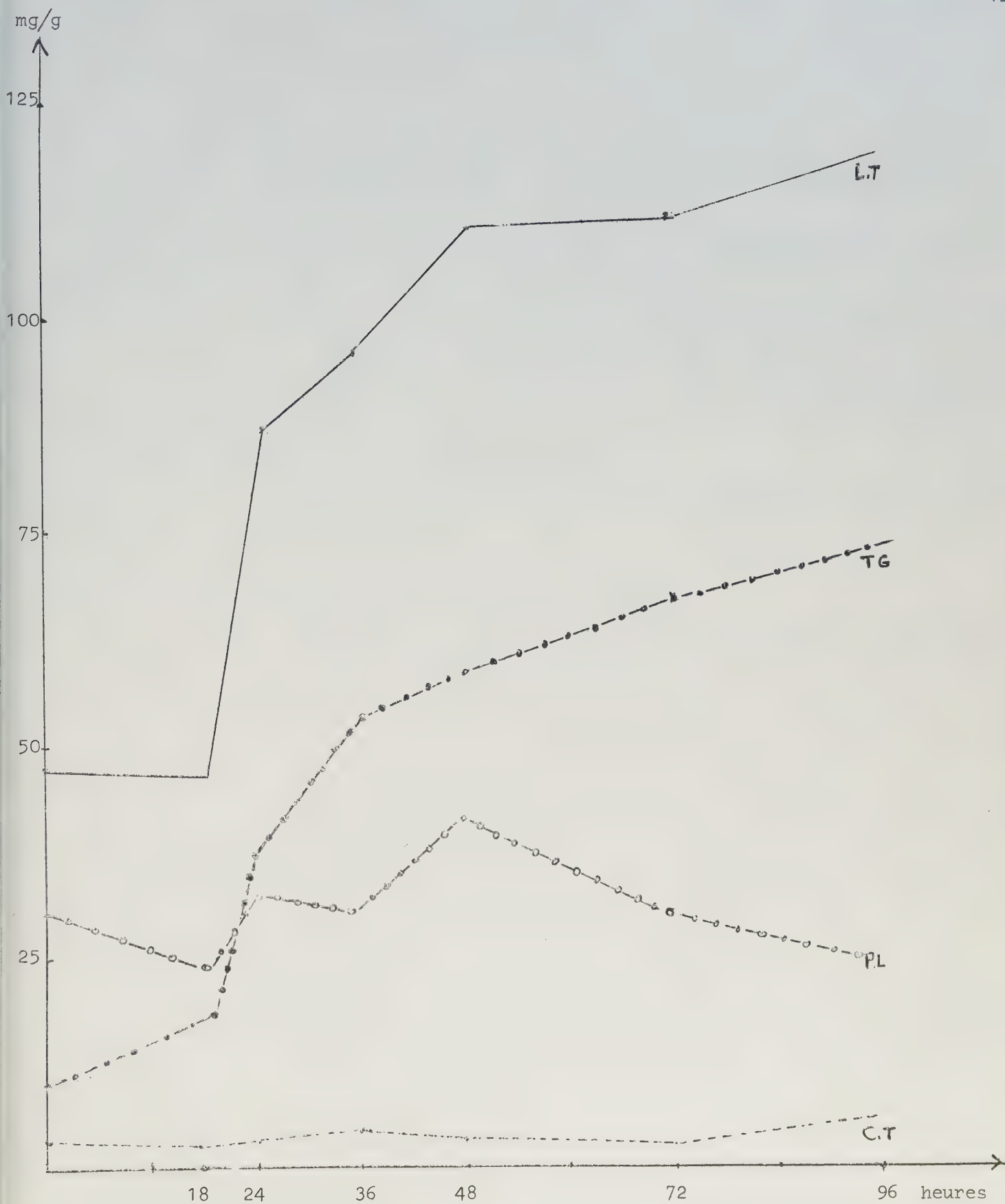


Figure VII - Evolution des lipides hépatiques des rats après intoxication par le phosphore blanc (10 mg/kg en S.C.)

Une évolution assez comparable est notée chez les rats morts en cours d'expérimentation (tableau 6) :

- lipides totaux et triglycérides sont pratiquement normaux chez les deux rats morts en moins de 24 heures,
- ils sont très augmentés chez les sept rats morts entre 24 et 48 heures ; le cholestérol total est également assez élevé ,
- l'augmentation des lipides totaux et des triglycérides est particulièrement considérable chez le rat mort entre 48 et 72 heures.

4- Action sur les enzymes hépatiques

Les résultats des diverses activités enzymatiques mesurées sont portés aux tableaux 7a et 7b.

a- Glucose-6-phosphate déshydrogénase

Les résultats obtenus pour la glucose-6-phosphate déshydrogénase peuvent surprendre quelque peu. En effet, si l'activité de cette enzyme est identique à celle des témoins à la 18ème heure, on constate une diminution au bout de 24 heures, mais qui n'est pas significative en raison de la différence importante des variances. A la 36ème heure, par contre, on observe une augmentation significative : il convient, toutefois, de l'accueillir avec une certaine réserve car elle n'a été enregistrée que chez trois rats seulement, les deux autres, qui avaient reçu le toxique en même temps, étant morts avant ce délai.

A la 48ème heure, l'activité de la glucose-6-phosphate déshydrogénase se rapproche de celle des témoins et elle paraît abaissée à la 72ème heure et surtout à la 96ème heure.

b- Lacticodéshydrogénase

La lacticodéshydrogénase ne montre pas de variation d'activité notable jusqu'à la 36ème heure. On observe ensuite une diminution si-

DELAI	LIPIDES				HEPATIQUES		(mg/g)
	LA	MORT	L. T.	TG.	C. T.	PL.	
24 heures	m		44,6	11,2	3,56	27,4	
entre 24 et	m		76,9	36,0	4,12	30,3	
48 heures	s		12,2	8,7	0,52	3,8	
entre 48 et 72 heures	m		126	68,0	3,43	29,7	

TABLEAU 6

Lipides hépatiques des rats morts au cours de l'intoxication par le phosphore blanc (10mg/kg en S.C.)

	Enzymes Hépatiques (UI/g. protéines)			
	G6PD	LDH	MDH	ALDOLASE
Témoins	m	618	1196	11,86
	s	296	316	3,24
18 heures	m	542	1916	13,32
	s	104	183	1,39
	p	N. S.	<0,001	N. S.
24 heures	m	547	893	10,01
	s	54	158	1,08
	p	N. S.	N. S.	N. S.

TABLEAU 7a

Action du phosphore blanc (10 mg/kg en S.C.) sur certaines enzymes hépatiques du rat.

		Enzymes Hépatiques (UI/g protéines)			
		G6PD	LDH	MDH	ALDOLASE
36 heures	m	16,64	640	1479	12,47
	s	6,75	283	578	2,48
	p	<0,05	N. S.	N. S.	N. S.
48 heures	m	11,19	261	1031	8,97
	s	3,15	78	113	0,69
	p	N. S.	<0,05	N. S.	<0,05
72 heures	m	5,56	345	535	4,40
96 heures	m	3,78	451	542	5,23

TABLEAU 7b

Action du phosphore blanc (10 mg/kg en S.C.) sur certaines enzymes hépatiques du rat.

gnificative au bout de 48 heures, mais qui semble s'atténuer au-delà de ce délai.

c- Malicodéshydrogénase

Les seules modifications observées pour la malicodéshydrogénase sont une augmentation très significative et surprenante au bout de la 18ème heure et une diminution à la 72ème heure.

d- Fructose-1-6-diphosphate aldolase

Ce n'est qu'à partir de la 48ème heure que l'on constate une diminution légère, mais significative, de l'activité de l'aldolase et qui semble s'accentuer par la suite.

5- Action sur les lipides sériques

Cette action sur les lipides circulants est particulièrement nette. Les différentes données numériques sont portées aux tableaux 8a et 8b.

a- Lipides totaux

Leur diminution est significative dès la 18ème heure ; elle s'accroît entre 18 et 24 heures et atteint son maximum à la 36ème heure. La lipidémie remonte ensuite, mais si elle est encore significativement plus basse que celle des témoins à la 48ème heure, elle la dépasse à partir de la 72ème heure. Il faut noter, qu'à ce dernier temps, les valeurs sont très différentes pour les deux rats, la lipidémie étant très élevée chez l'un des deux ; à la 96ème heure, par contre, les chiffres sont assez voisins chez les deux animaux.

b- Triglycérides

Les triglycérides sont affectés plus tardivement que les lipides totaux : ils sont encore très voisins de ceux des témoins à la 18ème heure. Ils diminuent de façon rapide jusqu'à la 24ème heure

	Lipides Sériques (g/l)				
	L. T.	T. G.	C. T.	P. L.	
Témoins	m	3,05	0,73	0,66	1,34
	s	0,60	0,12	0,19	0,33
18 heures	m	2,24	0,71	0,39	0,75
	s	0,33	0,34	0,07	0,24
	p	<0,01	N. S.	<0,01	<0,01
24 heures	m	1,25	0,33	0,21	0,42
	s	0,33	0,07	0,04	0,21
	p	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

TABEAU 8a

Action du phosphore blanc (10 mg/kg en S.C.) sur les lipides sériques du rat.

		Lipides Sériques (g/l)			
		L. T.	T. G.	C. T.	P. L.
36 heures	m	1,03	0,30	0,17	0,42
	s	0,43	0,01	0,06	0,31
	p	<0,001	<0,001	<0,001	<0,01
48 heures	m	1,67	0,36	0,36	1,09
	s	0,60	0,08	0,14	0,42
	p	<0,001	<0,001	<0,01	N. S.
72 heures	m	3,68	0,45	1,08	prélèvements
96 heures	m	3,35	0,52	1,05	insuffisants

TABEAU 8b

Action du phosphore blanc (10 mg/kg en S.C.) sur les lipides sériques du rat.

puis beaucoup plus lentement jusqu'à la 36ème heure, où ils atteignent leur niveau le plus bas. Il faut remarquer, à ce dernier temps, la valeur particulièrement faible de l'écart-type, les triglycéridémies des trois rats intoxiqués étant extrêmement voisines (0,29 ; 0,30 et 0,31g/l). Les triglycérides remontent ensuite légèrement mais en restant toujours inférieurs à ceux des témoins.

c- Cholestérol total

La diminution du cholestérol total est progressive et les valeurs les plus basses sont atteintes au bout de 36 heures. La cholestérolémie augmente ensuite ; à la 48ème heure elle est encore abaissée de façon significative mais, par contre, elle est supérieure à celle des témoins aux 72ème et 96ème heures. Il faut noter qu'à ces deux derniers temps les sérums des animaux intoxiqués présentaient un aspect ictérique d'intensité variable ; cette présence de bilirubine a pu entraîner une erreur par excès lors du dosage du cholestérol, puisque nous utilisons une méthode directe sans extraction. Elle est néanmoins sans rapport avec l'augmentation de la cholestérolémie constatée.

d- Phospholipides

L'évolution des phospholipides est assez comparable à celle du cholestérol total, mais leur augmentation entre les 36ème et 48ème heures est plus rapide et, à ce dernier temps, il n'y a déjà plus de différence significative entre témoins et intoxiqués. Les phospholipides n'ont pu être dosés, ensuite, que chez le rat le plus ictérique à la 72ème heure : ils étaient très élevés (3,31g/l).

La figure VIII illustre bien ces variations des différentes classes de lipides circulants. On assiste donc à leur diminution plus ou moins progressive jusqu'à la 36ème heure, la pente étant particulièrement marquée entre les 24ème et 36ème heures pour les différents

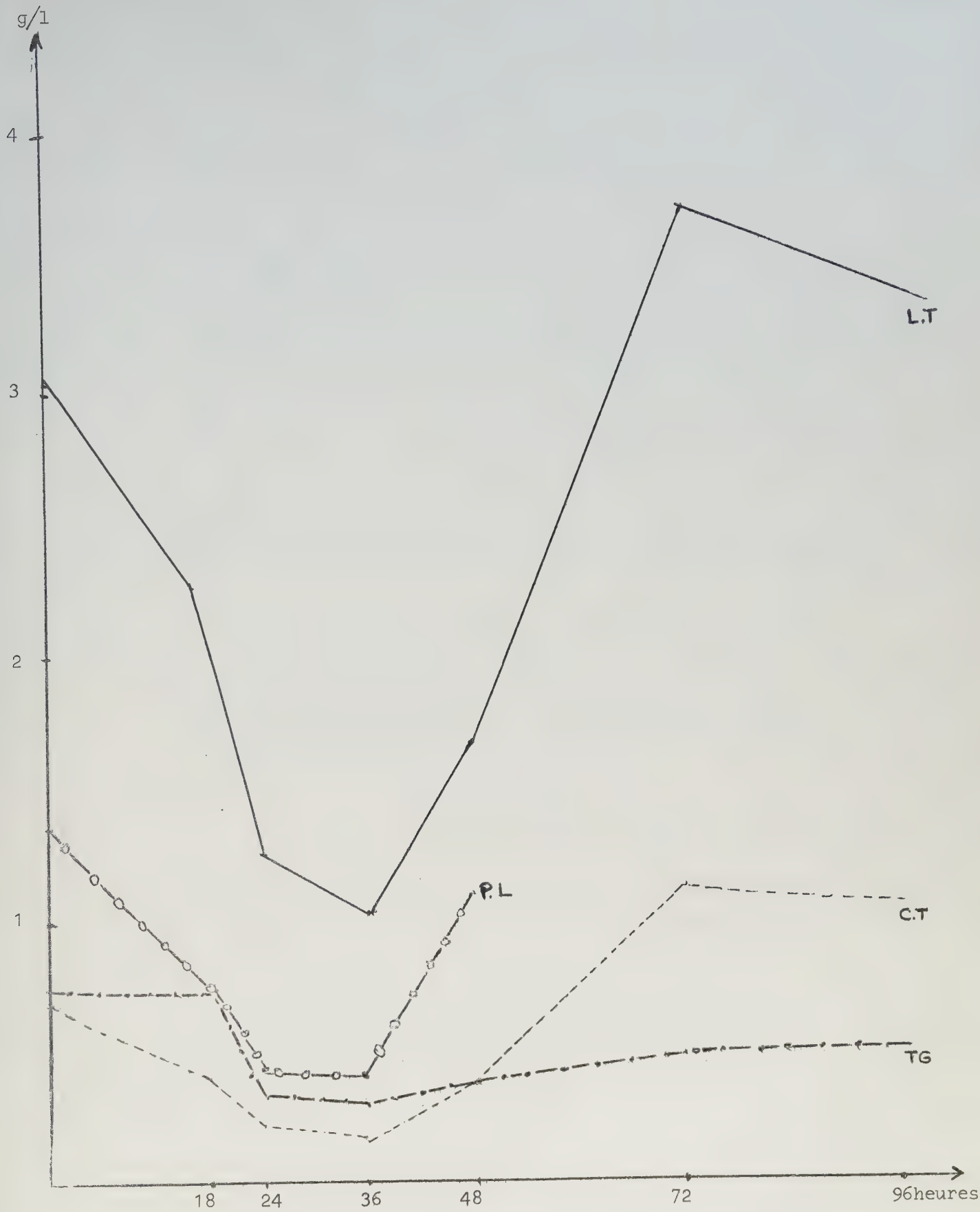


Figure VIII - Evolution des lipides sériques chez le rat après intoxication par le phosphore blanc (10mg/kg en S.C.)

paramètres.

Après 36 heures, la tendance à la remontée est très variable selon les constituants.

C- DISCUSSION

Quels enseignements peut-on tirer de ces différents résultats ?

1- Tolérance générale en fonction de la durée d'exposition

La mortalité la plus importante est observée entre vingt-quatre et quarante huit heures après l'administration du toxique. La mort est donc relativement retardée et semble due, par conséquent, à des phénomènes non immédiats.

La quantité de phosphore blanc que nous avons utilisée - 10mg/kg - est vraisemblablement très voisine de la dose létale 100 ; en effet nous n'avons pas pu enregistrer de survie au delà de la quatre-vingt seizième heure, lors d'expériences complémentaires.

Nous avons pu constater que cette dose est sûrement stéatogène et il semble ainsi que la marge est faible entre la dose mortelle et celle produisant la stéatose hépatique, comme l'ont d'ailleurs supposé, dès 1935, BEST, MAC LEAN & RIDOUT (31).

Pour ce qui est de l'action sur le poids corporel, nous avons vu qu'elle était, par suite des conditions de l'intoxication, obligatoirement limitée. Cependant, lorsque la durée d'exposition au phosphore est suffisante, on retrouve cette action inhibitrice sur la croissance que nous avons déjà observée lors de l'administration répétée de toxique.

2- Action sur le poids du foie

L'action sur le poids du foie est particulièrement nette puisque celui-ci est toujours augmenté significativement, de même que, par conséquent, le rapport F/C. Il est important de remarquer que le chiffre enregistré à la 96ème heure (4,35), c'est-à-dire à un moment où le phosphore blanc exerce sûrement une action sur le poids corporel, est très voisin de celui obtenu (4,78) dans le cas du rat très stéatosé de l'expérience de répétition de la dose 5mg/kg.

L'administration unique du toxique confirme donc la tendance à l'augmentation du poids du foie observée lors de cet essai de doses répétées.

3- Action sur les lipides hépatiques

La fait dominant que l'on constate à la suite de l'injection unique par voie sous-cutanée d'une quantité de phosphore de 10mg/kg est l'augmentation des triglycérides qui représentent à partir de la 36ème heure plus de 50% des lipides totaux, alors qu'ils ne constituent normalement qu'environ 20% de ceux-ci ; leur concentration est même supérieure, toujours au bout de ce délai, à celle des lipides totaux des animaux témoins. C'est cette augmentation des triglycérides hépatiques qui caractérise au point de vue biochimique la "stéatose vraie" que provoque, par conséquent, le phosphore blanc.

La conséquence en est, bien évidemment, une augmentation sensiblement correspondante des lipides totaux, mais qui se manifeste avec un léger décalage par suite de la diminution initiale des phospholipides. Notons que SEAKINS & ROBINSON (352) ont aussi observé une diminution de la concentration de ces composés chez des rats intoxiqués par le phosphore blanc et que nous l'avions, également, enregistrée dans l'essai de répétition de la dose 2,5mg/kg (cf. tableau 1). Les phospholipides sont, par contre, augmentés à un stade plus tardif (48 heures) puis semblent se normaliser avant de diminuer.

Quant au cholestérol, s'il apparaît initialement (18 heures) diminué il est, par contre, augmenté à partir de la 36ème heure. Une telle augmentation a été observée également par SEAKINS & ROBINSON (352).

On peut donc estimer pour ces deux derniers paramètres, que leurs variations sont relativement faibles, assez inconstantes et, de ce fait, assez hasardeuses à interpréter.

4- Action sur les enzymes hépatiques

Une remarque identique pourrait être émise à propos des variations des activités enzymatiques hépatiques qu'il est, par conséquent, difficile de discuter.

Il nous faut signaler, cependant, que l'augmentation de l'activité de la glucose-6-phosphate déshydrogénase observée à la trente-sixième heure est en contradiction avec ce que nous avons observé lors des essais précédents de doses répétées. Nous devons remarquer, toutefois, que cette augmentation, relativement peu importante, n'a été enregistrée qu'au sein d'un groupe de trois animaux ce qui en diminue quelque peu la valeur. De toute façon, même si cette augmentation se produit, elle semble intervenir trop tardivement pour expliquer le déclenchement de la stéatose, d'autant que l'activité de cette enzyme est sensiblement normale aux 18ème et 24ème heures, c'est-à-dire à une période où l'augmentation des triglycérides est particulièrement rapide.

Il nous faut, par ailleurs, rapprocher la diminution progressive constatée pour l'aldolase avec celle déjà enregistrée lors des essais de doses répétées et variables.

On soulignera, enfin, que l'activité des différentes enzymes étudiées est toujours diminuée à un stade relativement tardif (à partir de la 72ème heure). Ceci témoigne de la gravité de l'atteinte de la cellule

hépatique sous l'action du phosphore blanc.

5- Action sur les lipides sériques

Les résultats ont mis en relief, jusqu'à la 36ème heure, une action presque uniforme du toxique sur les diverses classes de lipides circulants qu'il fait baisser. Mais il est particulièrement important de remarquer que la diminution des triglycérides intervient plus tardivement au niveau du sérum que leur augmentation au niveau du foie. Une constatation similaire a été faite par LOMBARDI & RECKNAGEL (258). Pour essayer d'expliquer le caractère précoce de l'augmentation des triglycérides hépatiques par rapport à la diminution des triglycérides sériques, on peut, indépendamment de tout autre mécanisme, avancer les deux hypothèses suivantes, qui ne sont qu'en apparence contradictoires :

- soit, il se produit une saturation progressive de la capacité d'excrétion hépatique des triglycérides ; leur concentration va alors s'élever "in situ" avant que ne se manifeste une hypotriglycérémie,
- soit, il se produit un blocage brutal et immédiat de l'excrétion des triglycérides hépatiques, ceux du sérum ne diminuant pas aussitôt par suite de leur épuration progressive.

Il nous faut noter que c'est le contraire de ce qui se produit dans la stéatose induite par le tétrachlorure de carbone (256), ce solvant chloré provoquant, chez le rat, une chute des triglycérides sériques plus précoce que l'augmentation de ces composés dans le foie.

Au delà de la 36ème heure, si les triglycérides restent toujours bas bien qu'ils s'élèvent légèrement, par contre, le cholestérol et surtout les phospholipides augmentent assez rapidement. Ce dernier phénomène peut être la conséquence d'un processus rétentionnel surajouté, d'autant qu'à partir de la 72ème heure, les animaux présentent un ictère dont l'intensité est très variable. Remarquons que c'est le rat le plus ictérique qui montre la stéatose la plus marquée. Nous serons amenés à

revenir, ultérieurement, sur ces phénomènes importants.

Pour conclure, momentanément, nous pouvons donc affirmer que l'injection sous-cutanée de phosphore blanc à la dose de 10mg/kg provoque essentiellement :

- d'une part, une augmentation des triglycérides et, par conséquent, des lipides totaux hépatiques, qui paraît devoir se poursuivre jusqu'à la mort,
- d'autre part, une diminution des différents lipides circulants qui atteint son maximum à la 36ème heure.

Ce dernier temps nous paraît tout à fait intéressant pour effectuer une expérience complémentaire, d'autant que les modifications enregistrées au bout de ce délai ne l'ont été que chez un nombre restreint d'animaux (trois), en raison de la mortalité assez importante enregistrée. Si certaines des variations observées sont trop nettes pour prêter à contestation, il n'en est pas de même pour certaines autres qui méritent d'être contrôlées. C'est le cas, notamment de celle de la glucose-6-phosphate déshydrogénase, étant données les conséquences possibles des modifications éventuelles de son activité au niveau du métabolisme lipidique.

Cet essai complémentaire nous permettra, en outre, d'étudier d'une part; la reproductibilité de l'action du toxique dans le temps et, d'autre part, les éventuelles variations de deux composés biologiques particulièrement importants : les acides gras non estérifiés plasmatiques et la transaminase glutamique-pyruvique hépatique.

III- ETUDE DE LA REPRODUCTIBILITE DE L'ACTION STEATOGENE DU PHOSPHORE BLANC

A- PROTOCOLE

Cette expérience a donc été réalisée en injectant, par la voie sous-cutanée, le toxique à la dose de 10 mg/kg à un nombre relativement élevé de rats : quatorze, afin de disposer d'un nombre suffisant de survivants, la mortalité étant déjà appréciable au bout de ce délai. Quatre rats servent de témoins.

Les animaux sont soumis à un jeûne portant uniquement sur la nourriture solide dix-huit heures avant le sacrifice qui a lieu trente six heures après l'injection.

B- RESULTATS

Les différents résultats obtenus au cours de cet essai sont réunis dans le tableau 9. Mais, avant de les exposer, il convient d'envisager la tolérance du phosphore par les animaux intoxiqués.

1- Tolérance

La mortalité est importante : sur les quatorze rats ayant reçu le toxique seulement six sont encore en vie au moment du sacrifice, ce qui représente une mortalité de l'ordre de 57 %, donc plus élevée que celle enregistrée lors du premier essai (40 %). La perte de poids est également légèrement plus marquée.

2- Action sur le poids du foie

Le poids de cet organe est augmenté significativement de même, par conséquent, que le rapport F/C. Il est tout à fait satisfaisant de constater que ce dernier a une valeur pratiquement identique à celle obtenue lors du premier essai (3,63).

	Foie (g)	F/C p 100	Lipides Hépatiques (mg/g)				Enzymes Hépatiques (UI/g protéines)				
			L .T.	TG.	C. T.	PL.	G6PD	LDH	MDH	ALD.	GPT
Témoins	m	2,53	43,9	5,20	2,07	30,1	6,99	807	1595	12,01	91,7
	s	0,33	2,4	0,83	0,13	3,2	1,89	287	412	2,70	15,5
Intoxiqués	m	3,62	88,2	44,2	2,82	32,7	8,54	757	1487	12,60	30,9
	s	0,48	9,2	8,7	0,20	1,3	1,72	217	216	1,03	9,0
P	< 0,02	< 0,01	< 0,001	< 0,001	< 0,001	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	< 0,001

	Lipides Sériques					A.G.N.E. (mEq/l)
	L.T. (g/l)	TG. (g/l)	C.T. (g/l)	PL. (g/l)		
Témoins	$2,79 \pm 0,17$	$0,95 \pm 0,24$	$0,55 \pm 0,06$	$1,01 \pm 0,14$	$0,753 \pm 0,083$	
Intoxiqués	$0,98 \pm 0,21$	$0,31 \pm 0,03$	$0,14 \pm 0,03$	$0,28 \pm 0,14$	$0,737 \pm 0,152$	
p	$< 0,001$	$< 0,001$	$< 0,001$	$< 0,001$	N.S.	

TABEAU 9

Action du phosphore blanc chez le rat (10 mg/kg en S.C. après 36 heures)

Tous les foies présentent une stéatose macroscopique importante, dont l'intensité est, cependant, variable.

3- Action biochimique sur le tissu hépatique

a- Lipides

Nous retrouvons, exactement, les modifications constatées la première fois pour les différents paramètres mesurés :

- une augmentation très importante, naturellement très significative, des triglycérides et, par suite, des lipides totaux,
- une augmentation très significative mais beaucoup moins importante du cholestérol total,
- une absence de variation significative de la concentration en phospholipides mais leur teneur totale est augmentée significativement ($p < 0,05$).

b- Enzymes

Une importante différence peut être notée par rapport à la première expérience : nous ne retrouvons pas l'augmentation de l'activité de la glucose-6-phosphate déshydrogénase qui est sensiblement normale. Les trois autres enzymes qui avaient été étudiées lors du premier essai (lacticodéshydrogénase et malicodéshydrogénase, aldolase) ne montrent pas non plus de variation significative.

L'activité de la nouvelle enzyme étudiée, la transaminase glutamique-pyruvique, est très significativement diminuée : elle ne représente plus qu'environ le tiers de l'activité initiale.

4- Action biochimique sur les lipides sériques

Nous relevons les mêmes modifications que celles constatées antérieurement, à savoir une diminution générale des différents lipides circulants, avec, pratiquement, la même intensité que précédemment. Il est particulièrement intéressant de noter que la concentration en triglycérides obtenue est très voisine de celle de la première expérience (0,30g/l) et que l'écart-type est également très faible. Seule la dimi-

nution des phospholipides est plus marquée que lors du premier essai.

Indiquons, d'autre part, que les acides gras non estérifiés ne montrent pas de variation significative.

C- DISCUSSION

Un certain nombre d'enseignements peuvent être tirés de cette expérimentation.

1- La reproductibilité de l'action stéatogène du phosphore blanc est tout à fait démontrée. Les effets, tant au niveau hépatique (excepté pour la glucose-6-phosphate déshydrogénase) que sérique, sont pratiquement identiques dans les deux expériences.

2- L'activité de la glucose-6-phosphate déshydrogénase, dont l'augmentation nous avait paru si étonnante et sujette à caution en raison du faible nombre d'animaux étudiés, ne semble pas en fait être modifiée par l'administration de phosphore blanc. Nous reviendrons à la fin de ce chapitre sur les conséquences que cela implique.

3- Comment peut-on expliquer la diminution d'activité de la transaminase glutamique-pyruvique hépatique ?

On peut penser, à priori, qu'elle provient d'une fuite de l'enzyme dans le sang. Cette éventualité est cependant discutable et il est regrettable que nous n'ayons pu déterminer l'activité dans le sérum. En effet, très récemment, en 1969, GHOSHAL & coll. (176) ont trouvé qu'il n'y avait pas de variation significative de l'activité de cette enzyme dans le sérum de rat intoxiqué par le phosphore blanc. On pourrait alors supposer

que cette diminution d'activité de l'enzyme refléterait éventuellement un trouble de la biosynthèse des protéines spécifiques.

4- Nous ne discuterons pas maintenant de l'absence de variation significative des acides gras non estérifiés plasmatiques car nous en reparlerons plus longuement dans la cinquième partie.

5- La surcharge du foie en lipides, et notamment en triglycérides ne suffit pas à expliquer malgré sa netteté l'augmentation importante (environ 35 %) du poids de cet organe. En effet, si les lipides hépatiques augmentent de plus de 100 %, ils ne représentent, chez le rat normal, que 5 % environ du poids du foie.

Aussi, avant d'aller plus loin dans l'étude de la stéatose phosphorée, nous paraît-il utile d'essayer de comprendre l'origine de cette augmentation pondérale du foie. C'est ce que nous avons tenté de réaliser dans l'expérimentation suivante que nous allons décrire maintenant.

IV- ETUDE DE L'AUGMENTATION PONDERALE DU FOIE

A- PROTOCOLE

Nous avons pratiqué une injection sous-cutanée de phosphore blanc à la dose de 10 mg/kg à cinq rats ; deux autres servent de témoins. Les animaux survivants sont soumis à un jeûne, portant uniquement sur nourriture solide, dix-huit heures avant le sacrifice qui a lieu trente six heures après l'injection.

Les foies sont prélevés, lavés, séchés, pesés et coupés en morceaux. Sur une partie aliquote est effectuée la détermination de la teneur

en eau par dessiccation à + 110°C puis conservation pendant vingt quatre heures dans un dessiccateur maintenu sous vide.

Une seconde partie aliquote est utilisée pour préparer un homogénat au dixième dans du saccharose 0,25M, sur lequel est réalisé un dosage de l'azote total et des protéines totales.

B- RESULTATS

Une mortalité importante s'est manifestée puisque deux animaux sur les cinq intoxiqués ont survécu. C'est pourquoi nous avons indiqué uniquement, dans le tableau 10, les valeurs individuelles des deux rats témoins et de ces deux rats traités, ainsi que leur moyenne respective.

1- Action sur le poids du foie

Nous retrouvons l'augmentation déjà constatée précédemment, qui détermine une hausse consécutive du rapport F/C, qui est même un peu plus importante que lors des deux expériences antérieures par suite d'une action plus marquée du toxique sur le poids corporel.

Le foie des deux animaux intoxiqués présente une stéatose macroscopique.

2- Action sur l'azote total hépatique

Si l'on observe une diminution importante (27 %) de la concentration du foie en azote total, sa teneur globale est, par contre, légèrement augmentée (environ 13 %).

3- Action sur les protéines totales hépatiques

La concentration des foies en protéines totales est encore plus abaissée (34 % environ) que celle en azote total, mais leur teneur globale est très voisine de celle des témoins.

	FOIE (g)	F/C en %	AZOTE TOTAL		PROTEINES TOTALES		TENEUR EN EAU	
			mg/g	mg/foie	mg/g	mg/foie	p 100	g/foie
Témoins	n° 1	2,30	35,4	357,5	155,7	1573	73,7	7,444
	n° 2	2,46	31,0	362,7	141,3	1653	73,4	8,588
	m	2,38	33,2	360,1	148,5	1613	73,55	8,016
Intoxiqués	n° 1	3,86	23,7	395,8	97,0	1620	74,0	12,358
	n° 2	3,78	24,6	408,4	96,9	1609	73,2	12,151
	m	3,82	24,15	402,1	96,95	1614,5	73,6	12,255

TABEAU 10

Etude de l'augmentation pondérale du foie des rats intoxiqués par le phosphore blanc (10 mg/kg en S.C. après 36 heures)

4- Action sur la teneur en eau

Si la teneur en eau du tissu hépatique est identique chez les rats témoins et intoxiqués, il n'en est pas de même de l'eau totale de l'organe, qui est augmentée dans une proportion considérable, d'environ 50 %, chez les animaux traités.

C- DISCUSSION

La diminution de la concentration en azote total est due essentiellement à la chute de la concentration en protéines par unité de poids de tissu. Elle est cependant proportionnellement moins marquée, sans doute parce que d'autres composés azotés-notamment la majeure partie des phospholipides- ne subissent pas de modification à la trente-sixième heure (cf. tableaux 5b et 9). Cette chute de la concentration du foie en protéines semble due, en partie, à un ralentissement de la synthèse protéique ; en effet SEAKINS & ROBINSON (352) ont trouvé une diminution de l'incorporation de la DL-leucine dans les protéines hépatiques du rat intoxiqué par le phosphore blanc. Il est à noter que cette perte en protéines qui est voisine de 50 mg/g d'organe est compensée en majeure partie par le "gain" en lipides qui est, comme nous l'avons constaté à deux reprises, de l'ordre de 45 mg/g.

Il est très surprenant de constater que l'accumulation dans la cellule hépatique de substances aussi hydrophobes que les triglycérides (qui sont les responsables essentiels de la surcharge en lipides) ne s'accompagne pas d'une diminution de la teneur en eau tissulaire. On peut alors admettre que cette augmentation de la concentration en lipides se produit au prix d'une hypertrophie des cellules parenchymateuses hépatiques. Ce gonflement de la cellule aurait pour effet d'amplifier la chute de la concentration en protéines et permettrait d'expliquer le maintien de la teneur totale en ces constituants et l'augmentation de la teneur totale en

eau de l'organe. C'est essentiellement cette dernière qui paraît donc responsable de l'augmentation du poids des foies stéatosés.

L'architecture plus lâche de ces organes, consécutive à cette hypertrophie et à cette augmentation de l'eau totale, nous permet de mieux comprendre leur consistance beaucoup plus molle et leur fragilité beaucoup plus grande que nous avons toujours constatées lors de leur manipulation.

*
* *

Quelles sont les premières conclusions que l'on peut tirer de ces expériences successives d'administration du phosphore blanc ?

1- L'injection sous-cutanée de ce toxique à des rats, soit à des doses relativement faibles (2,5 et 5 mg/kg) mais répétées, soit à une dose unique plus importante (10 mg/kg), provoque au niveau du foie le même phénomène biologique sur le plan qualitatif : la stéatose, dont la traduction biochimique est une augmentation des triglycérides hépatiques. Cependant, l'administration de la dose unique de 10 mg/kg donne des résultats qui sont plus reproductibles d'un animal à l'autre, plus nets, et qui confirment exactement les tendances relevées lors des essais de répétition de doses.

Ces derniers présentent, cependant, l'intérêt de bien mettre en valeur l'effet inhibiteur exercé par le phosphore sur la croissance du rat.

2- La quantité nécessaire pour provoquer de façon certaine cette stéatose, représente une dose sans doute mortelle (10 mg/kg) puisque nous n'avons pas observé de survie au delà de la quatre-vingt seizième heure.

3- L'augmentation des triglycérides hépatiques s'observe dès la dix-huitième heure, avant même que ne se manifeste une modification des triglycérides sériques. C'est entre dix-huit et vingt-quatre heures que l'évolution des divers paramètres, qui sont modifiés (lipides totaux et triglycérides hépatiques, différents constituants lipides sériques), est la plus intense. C'est à la trente sixième heure que l'on constate le maximum d'effet au niveau sanguin avec ^{une} stéatose hépatique déjà bien installée. Ce temps de trente six heures semble, d'ailleurs, représenter le moment où "la stéatose pure" est optimale car au delà on voit apparaître des signes de complication (ictère, rétention....?).

4- La stéatose phosphorée n'est vraisemblablement pas due à un accroissement de la biosynthèse intrahépatique des triglycérides car nous n'avons pas constaté d'augmentation de l'activité de la glucose-6-phosphate déshydrogénase et de la fructose 1-6 diphosphate aldolase. Nous discuterons cet aspect plus en détail dans la cinquième partie.

5- Si la synthèse hépatique des deux constituants des triglycérides, acides gras et glycérol n'est pas augmentée, on peut imaginer, afin d'expliquer la surcharge du foie en triglycérides, que ces deux composés proviennent des tissus périphériques et, plus particulièrement, du tissu adipeux.

6- L'inhibition possible de la synthèse protéique pourrait également provoquer l'apparition de la stéatose par absence des formes de transport des triglycérides hépatiques vers les tissus de réserve.

L'étude de ces hypothèses va nous entraîner plus avant dans l'exploration du mécanisme de la stéatose phosphorée qui va constituer, plus précisément, le sujet de la cinquième partie que nous allons aborder maintenant.

CINQUIEME PARTIE

MISE EN EVIDENCE DU MECANISME BIOCHIMIQUE

DE LA STEATOSE PHOSPHOREE

- Chapitre Premier : Etude cinétique de la mobilisation des lipides périphériques.
- Chapitre Deuxième : Etude de l'incorporation de l'acide palmitique tritié.
- Annexe : Anatomo-Pathologie.

Avant d'envisager les différentes étapes de cette étude, il nous paraît utile de nous replacer dans le contexte des quatre hypothèses très générales, que l'on peut envisager pour expliquer la formation de la stéatose hépatique toxique et que nous avons évoquées dans le troisième chapitre de la deuxième partie.

1- Le phosphore blanc ne provoque vraisemblablement pas d'augmentation de la synthèse intrahépatique des triglycérides. En effet, nous n'avons pas trouvé d'augmentation, sous l'action de ce toxique, de l'activité de deux enzymes intervenant dans la biosynthèse des constituants de base des triglycérides: d'une part la première enzyme, la glucose-6-phosphate déshydrogénase qui est la principale responsable de la formation de NADPH qui est nécessaire aux deux étapes réductrices de la biosynthèse des acides gras dans la phase soluble (cf. figures II et III). D'autre part, la seconde enzyme la fructose 1-6 diphosphate aldolase, qui permet la production de la phosphodihydroxyacétone qui est un des principaux précurseurs du glycérol lipidique.

Si la synthèse des deux éléments constitutifs des triglycérides : acides gras et glycérol, n'est pas augmentée, celle des triglycérides ne l'est vraisemblablement pas non plus.

Une autre constatation renforce cette opinion. En effet, s'il se produisait une augmentation de la biosynthèse intrahépatique des triglycérides, on devrait assister, si leur sécrétion est normale, à leur augmentation, dans le plasma puisque la principale voie d'utilisation des triglycérides hépatiques est leur libération dans la circulation (17). Or, non seulement nous n'avons pas observé d'augmentation de la triglycéridémie, mais à l'inverse celle-ci est diminuée de façon très importante.

Il en résulte donc que l'augmentation de la synthèse intrahépatique des triglycérides ne peut être retenue comme mécanisme biochimique provoquant la stéatose phosphorée.

2- Nous avons déjà signalé que la dégradation hépatique des triglycérides constituait une voie très mineure d'utilisation de ces molécules. De ce fait son étude nous a-t-elle paru peu féconde surtout si l'on tient compte des difficultés techniques qu'elle aurait soulevées et plus particulièrement celles relatives à l'expérimentation "in vitro" et à son extrapolation à l'organisme entier.

Ce sont donc les deux dernières hypothèses que nous allons tenter d'explorer dans cette cinquième partie :

3- L'augmentation de la mobilisation des acides gras et du glycérol du tissu adipeux vers le foie et,

4- La diminution de l'utilisation des triglycérides hépatiques, celle-ci consistant surtout en leur sécrétion dans le plasma sous forme de lipoprotéines (17).

CHAPITRE PREMIER

ETUDE CINETIQUE DE LA MOBILISATION DES LIPIDES PERIPHERIQUES

L'étude cinétique de la mobilisation des lipides périphériques va donc consister à explorer une augmentation éventuelle de la lipolyse au niveau du tissu adipeux. En effet, si le phosphore blanc est doué de propriétés adipocinétiques, il doit en résulter un certain nombre de phénomènes successifs (101) :

- tout d'abord une hydrolyse des triglycérides de réserve du tissu adipeux, ce qui entraînera une augmentation des acides gras non estérifiés et du glycérol dans ce tissu,
- ensuite une décharge du glycérol et d'une partie des acides gras non estérifiés dans le sang où ces derniers circulent sous forme de complexes avec l'albumine,
- puis une captation du glycérol et d'une partie de ces acides gras circulants, nouvellement mobilisés, par le foie et une réestérification qui vont provoquer une accumulation de triglycérides et, donc, la stéatose,
- enfin, la libération des triglycérides du foie dans le courant circulatoire sous forme de lipoprotéines légères, riches en triglycérides.

L'exploration "in vivo" d'un tel processus va pouvoir être réalisée en dosant, d'une part, les acides gras non estérifiés plasmatiques et le glycérol sérique, lequel est un témoin encore plus fidèle de l'intensité de la lipolyse au niveau du tissu adipeux, ainsi que les triglycérides sériques, et, d'autre part, les triglycérides hépatiques.

Il est évident que ces différentes mesures, et, surtout les deux premières, doivent être effectuées antérieurement à l'installation de la stéatose hépatique.

A- PROTOCOLE

Nous avons donc pratiqué une injection sous-cutanée de phosphore blanc à la dose de 10 mg/kg à des rats et procédé au sacrifice aux temps successifs suivants :

3 heures
6 heures
9 heures
12 heures
15 heures

après l'administration du toxique.

Pour chacune de ces cinq expérimentations cinq rats servent de témoins et cinq autres reçoivent le phosphore blanc. Tous sont soumis à un jeûne portant uniquement sur la nourriture solide dix-huit heures avant le sacrifice.

Lors de celui-ci, une partie du sang est recueillie sur héparine afin de doser les acides gras non estérifiés plasmatiques et l'autre partie sans anticoagulant afin de déterminer le glycérol et les triglycérides sériques.

Les foies sont prélevés, lavés, séchés, pesés et l'on effectue un bilan lipidique.

B- RESULTATS

Les différents résultats obtenus sont portés aux tableaux 11a et 11 b.

Avant de les décrire, il nous faut signaler que, si l'on n'observe aucun effet du phosphore blanc sur le poids du foie jusqu'à la neuvième heure, on note par contre, à partir de la douzième heure, une augmentation très significative ($p < 0,001$) de ce poids qui provoque une augmentation également très significative ($p < 0,001$) du rapport F/C dont les valeurs, chez les témoins et les intoxiqués, sont respectivement $2,64 \pm 0,18$ et $3,47 \pm 0,21$. L'augmentation de ce rapport est retrouvée à la quinzième heure, mais la signification est moins importante ($p < 0,01$) par suite d'une variabilité, chez les animaux intoxiqués, plus grande qu'à la douzième heure ($2,80 \pm 0,08$ pour les rats témoins et $3,62 \pm 0,39$ pour les intoxiqués).

1- Acides gras non estérifiés plasmatiques

Si l'on peut noter quelques variations de leur concentration (légère diminution aux troisième, sixième et douzième heures, légère augmentation aux neuvième et quinzième heures), celles-ci sont assez faibles, inconstantes et, surtout, non significatives.

Rappelons, par ailleurs, que ces acides gras non estérifiés ne subissent pas non plus de variation significative lorsque la stéatose est bien marquée (36 heures, cf. tableau 9).

2- Glycérol sérique

La seule variation significative que l'on enregistre pour le glycérol sérique est une faible diminution au bout de trois heures et qui confirme celle des acides gras non estérifiés.

Les modifications ultérieures (légère augmentation à la sixième heure, légère diminution à la neuvième et à la douzième heure) sont, comme dans le cas des acides gras, minimes, inconstantes et non significatives.

Il convient de remarquer, d'autre part, qu'il n'y a pas de parallélisme absolu entre l'évolution de ces deux paramètres.

3- Triglycérides sériques

Les triglycérides sériques ne subissent aucune variation significative.

4- Lipides totaux hépatiques

Aucune modification des lipides totaux hépatiques n'est constatée jusqu'à la neuvième heure.

A la douzième heure, si la moyenne générale des rats intoxiqués ne diffère pas significativement de celle des témoins, il faut, cependant noter qu'un des animaux présente une augmentation nette des lipides totaux (61,1 mg/g).

A la quinzième heure, la moyenne générale des intoxiqués est assez nettement supérieure à celle des témoins, mais elle n'en diffère pas significativement en raison de la différence des deux variances. En effet, sur les cinq rats ayant reçu le toxique, deux montrent une augmentation très nette et identique des lipides totaux hépatiques (67,1mg/g)

Il est particulièrement important de remarquer qu'il n'y a pas de relation entre ces variations extrêmes des lipides hépatiques et celles concernant les acides gras non estérifiés et le glycérol sanguins des mêmes animaux.

5- Triglycérides hépatiques

Comme dans le cas précédent, aucune modification des triglycérides hépatiques n'intervient jusqu'à la neuvième heure.

A la douzième heure, une augmentation, proportionnellement plus marquée que celle des lipides totaux peut être notée, mais elle n'est pas plus significative en raison de la différence des variances qui tient à ce qu'un seul rat sur les cinq intoxiqués présente une augmentation importante des triglycérides (29,9 mg/g).

A la quinzième heure, on constate une augmentation significative de la concentration du foie en triglycérides. La réponse est cependant très variable selon les animaux. C'est ainsi que si l'on note chez deux rats une augmentation très importante des triglycérides (32,4 et 34,6 mg/g), celle-ci est nettement moins marquée chez le troisième (22,2 mg/g) et extrêmement faible chez les deux derniers (12,4 et 14,9 mg/g).

Signalons enfin, que l'on retrouve pour le cholestérol total et les phospholipides, les tendances relevées, dans une expérience déjà exposée, à la dix huitième heure c'est-à-dire une diminution faible mais, significative :

- cholestérol total (mg/g) à 12 heures :
 - témoins : $2,09 \pm 0,12$
 - intoxiqués : $1,80 \pm 0,23$ ($p < 0,05$)
- cholestérol total (mg/g) à 15 heures :
 - témoins : $2,11 \pm 0,10$
 - intoxiqués : $1,69 \pm 0,04$ ($p < 0,001$)
- phospholipides (mg/g) à 12 heures :
 - témoins : $29,2 \pm 0,4$
 - intoxiqués : $26,7 \pm 1,0$ ($p < 0,01$)
- phospholipides (mg/g) à 15 heures :
 - témoins : $29,9 \pm 1,4$
 - intoxiqués : $27,3 \pm 0,3$ ($p < 0,01$)

DUREE DE L'INTOXICATION		A. G. N. E. PLASMATIQUES (mEq/l)	GLYCEROL SERIQUE (mM/l)	TRIGLYCERIDES SERIQUES (g/l)	LIPIDES TOTAUX HEPATIQUES (mg/g)	TRIGLYCERIDES HEPATIQUES (mg/g)
3 Heures	Témoins	0,913 ± 0,079	0,243 ± 0,027	1,00 ± 0,28	47,3 ± 5,2	11,4 ± 2,6
	Intoxiqués	0,845 ± 0,109	0,193 ± 0,023	1,00 ± 0,34	46,1 ± 4,0	10,3 ± 4,5
	Valeur de p	N. S.	< 0,02	N. S.	N. S.	N. S.
6 Heures	Témoins	0,945 ± 0,212	0,199 ± 0,027	0,94 ± 0,11	42,9 ± 4,2	8,74 ± 3,47
	Intoxiqués	0,909 ± 0,332	0,210 ± 0,013	0,85 ± 0,14	43,3 ± 3,8	10,4 ± 2,4
	Valeur de p	N. S.	N. S.	N. S.	N. S.	N. S.

TABLEAU 11a

- Etude cinétique de la lipolyse chez le rat intoxiqué par le phosphore blanc (10mg/kg en S.C.)

DUREE DE L'INTOXICATION		A. G. N. E. PLASMATIQUES (mEq/l)	GLYCEROL SERIQUES (mM/l)	TRIGLYCERIDES SERIQUES (g/l)	LIPIDES TOTAUX HEPATIQUES (mg/g)	TRIGLYCERIDES HEPATIQUES (mg/g)
9 Heures	Témoins	0,907 ± 0,079	0,206 ± 0,026	0,67 ± 0,12	45,9 ± 3,2	9,25 ± 2,36
	Intoxiqués	1,020 ± 0,091	0,193 ± 0,025	0,64 ± 0,16	46,4 ± 2,8	9,90 ± 2,14
	Valeur de p	N. S.	N. S.	N. S.	N. S.	N. S.
12 Heures	Témoins	0,867 ± 0,198	0,263 ± 0,093	1,12 ± 0,51	46,5 ± 1,4	10,6 ± 2,2
	Intoxiqués	0,772 ± 0,055	0,238 ± 0,038	1,19 ± 0,14	50,8 ± 6,5	17,8 ± 7,2
	Valeur de p	N. S.	N. S.	N. S.	N. S.	N. S.
15 Heures	Témoins	0,849 ± 0,176	0,243 ± 0,017	0,90 ± 0,36	45,1 ± 3,5	9,20 ± 2,99
	Intoxiqués	0,917 ± 0,094	0,245 ± 0,023	0,71 ± 0,28	56,2 ± 10,8	23,3 ± 10,0
	Valeur de p	N. S.	N. S.	N. S.	N. S.	< 0,02

TABLEAU 11b

C- DISCUSSION

Le premier intérêt de cette étude est de nous permettre de compléter et dans une certaine mesure de confirmer, tout en apportant quelques nuances, les observations que nous avons faites lors de l'étude cinétique du développement de la stéatose phosphorée. En effet, l'augmentation significative des triglycérides hépatiques que nous avons trouvée dix-huit heures après l'administration du toxique se produit même dès la quinzième heure, voire chez certains animaux, dès la douzième heure. Elle se manifeste de façon beaucoup plus nette que l'élévation des lipides totaux qui n'est toujours pas significative après quinze heures d'intoxication. Mais surtout cette augmentation des triglycérides au niveau du foie est observée sans que l'on note de modifications de ces composés au niveau du sang, ce qui est une autre confirmation de nos premières constatations.

Il est particulièrement remarquable de noter que la diminution significative du cholestérol total et des phospholipides hépatiques que nous avons observée à la dix-huitième heure est également mise en évidence à la douzième et à la quinzième heure. Mais ces variations sont faibles et elles ne sauraient expliquer dans le cas des phospholipides, dont les premières étapes de la biosynthèse sont identiques à celles des triglycérides jusqu'au stade de l' $\alpha\beta$ -diglycéride (cf. figure IV), une augmentation de la synthèse des triglycérides.

Mais surtout le second intérêt de cette étude est de montrer que le phosphore blanc ne provoque pas d'augmentation des deux facteurs plasmatiques qui reflètent l'intensité de la lipolyse au niveau du tissu adipeux : les acides gras non estérifiés et, surtout, le glycérol.

En conséquence, l'augmentation de la mobilisation, à partir du tissu adipeux, de ces deux précurseurs des triglycérides hépatiques ne semble pas devoir être invoquée comme mécanisme biochimique susceptible de provoquer la stéatose phosphorée. Ce résultat nous paraît essentiel.

Comment, dès lors, expliquer cette accumulation de triglycérides dans le foie puisque l'on ne peut l'attribuer ni à une augmentation de la synthèse intra-hépatique des triglycérides ni à un accroissement de la mobilisation des lipides de réserve et qu'une éventuelle diminution de la dégradation hépatique des triglycérides semble devoir être écartée *a priori*, vue sa faible importance physiologique ?

Ce problème peut être abordé en étudiant l'utilisation des triglycérides hépatiques, c'est-à-dire essentiellement leur sécrétion dans le plasma sous forme de lipoprotéines légères.

Cette étude peut être réalisée en injectant et en suivant le sort de l'acide palmitique radioactif. Cette exploration présente en outre l'avantage de nous permettre de contrôler nos résultats précédents puisque la mesure de l'incorporation de cet acide gras marqué dans les lipides du foie nous renseignera sur l'intensité de sa captation par le tissu hépatique. Ces investigations font l'objet du chapitre suivant.

CHAPITRE DEUXIEME

ETUDE DE L'INCORPORATION DE L'ACIDE PALMITIQUE TRITIE

Cette étude a un triple but :

- Contrôler l'absence de modification de la lipolyse au niveau du tissu adipeux, que nous avons constatée au cours des expériences précédentes. En effet, si l'on injecte à un rat de l'acide palmitique tritié, sous forme de sel de sodium lié à l'albumine, celui-ci, étant donnée sa vitesse de renouvellement très rapide (17), va se trouver dilué dans le "pool" des acides gras non estérifiés circulants "froids" et suivre leur sort commun. Si le phosphore blanc provoque une augmentation de la lipolyse dans le tissu adipeux, les acides gras non estérifiés nouvellement mobilisés ainsi que le palmitate marqué, vont être captés de façon accrue par le foie et l'on assistera alors à une augmentation de l'activité spécifique des lipides totaux hépatiques.
- Observer s'il se produit une augmentation de la synthèse des triglycérides hépatiques. Les acides gras, une fois captés, vont participer, avec les acides gras endogènes, à la biosynthèse des triglycérides hépatiques et la mesure de l'activité spécifique de ces derniers contribuera à donner une idée de l'intensité de cette synthèse. On pourra de la même façon apprécier l'incorporation des acides gras dans les phospholipides hépatiques.
- Envisager le sort de ces triglycérides. Leur voie d'utilisation principale est représentée par leur sécrétion dans le plasma sous forme de β -lipoprotéines (VLDL et LDL). La mesure de l'activité de l'acide palmitique marqué incorporé dans les triglycérides de ces β -lipoprotéines pourra ainsi permettre de préciser l'intensité de l'utilisation des triglycérides hépatiques. Cette voie semble d'autant plus importante à explorer que nous avons montré que le phosphore blanc provoquait une diminution de la triglycéridémie (cf. tableaux 8a et 8b).

Les différentes expériences que nous avons entreprises au cours de cette étude n'ont pu être réalisées qu'après un certain nombre d'essais préliminaires qui étaient nécessaires en raison de la multiplicité des problèmes à résoudre, aussi bien d'ordre biologique que d'ordre technique.

I- MISE AU POINT D'UN PROTOCOLE EXPERIMENTAL ET DES TECHNIQUES D'ANALYSE

A- PROBLEMES D'ORDRE BIOLOGIQUE

1- Forme d'administration du traceur

Le traceur utilisé dans cette étude est l'acide palmitique marqué au tritium en position 9 et 10, qui est un corps particulièrement hydrophobe. Pour le solubiliser, nous avons tout d'abord utilisé de l'éthanol à 50° contenant de la soude à la concentration de 0,02N. Bien que l'acide palmitique administré ainsi en solution alcoolique alcaline s'incorporât dans les β -lipoprotéines sériques, ce véhicule était critiquable pour deux raisons principales :

- l'éthanol n'est pas sans effet sur la mobilisation des triglycérides du tissu adipeux (99) et il n'est donc pas satisfaisant de l'utiliser comme solvant, même dilué et sous un faible volume (0,20 ml),
- les acides gras non estérifiés plasmatiques circulant sous forme de complexes avec l'albumine, il ne semble donc pas parfaitement physiologique d'injecter de l'acide palmitique "libre".

Aussi avons-nous finalement administré ce traceur sous forme de sel de sodium lié à l'albumine dont la préparation a été décrite en détail dans le second chapitre de la troisième partie (Matériel et méthodes).

2- Voie d'administration du traceur

Il est logique d'introduire le traceur directement dans la circulation générale en faisant appel, par conséquent, à la voie intra-veineuse

qui est d'ailleurs utilisée le plus souvent dans les études de ce type (17, 18).

La veine choisie a été celle du pénis car son accès est relativement facile et non traumatisant. Au début, nous injectons le traceur directement dans cette veine avec une seringue à tuberculine en polypropylène de 1 ml, munie d'une aiguille de 45/100 de mm de section. La dispersion des résultats étant assez importante, nous nous sommes demandés si elle ne pouvait pas être due au fait que tous les animaux ne recevaient pas exactement la même quantité de traceur. Afin d'augmenter la sécurité de l'injection, il nous a semblé bien préférable de propulser celui-ci dans la circulation générale avec un volume déterminé (0,20 ml) de soluté isotonique de chlorure de sodium. Cette façon d'opérer nous oblige donc à ligaturer l'aiguille introduite dans la veine.

Il est bien évident que ces différentes opérations ne pouvaient être effectuées chez l'animal vigile et il s'est alors posé aussitôt le problème de l'anesthésie.

3- Anesthésie

Il nous a donc paru difficile d'éviter le recours à une anesthésie préalable des animaux. Celle-ci présente l'avantage, en outre, de permettre l'injection intraveineuse du traceur sans provoquer de "stress" important chez l'animal et elle était de toute façon nécessaire pour réaliser le sacrifice des rats sur lequel nous reviendrons.

Fallait-il donc anesthésier les animaux deux fois à l'éther, comme l'ont fait BAKER & SCHOTZ (17) ? La réponse est naturellement négative, car d'une part la quantité d'anesthésique inhalée par chacun des rats en expérience serait difficile à déterminer de façon simple et précise et, d'autre part, la répétition de l'anesthésie nous paraît extrêmement

discutable dans la mesure où elle risque d'entraîner des perturbations que nous aurions du mal à contrôler.

Il nous a finalement semblé préférable d'effectuer l'étude de l'incorporation de l'acide palmitique tritié chez les rats anesthésiés pendant toute la durée de l'expérience, les animaux étant endormis, avant l'injection du traceur, par l'uréthane, administré par voie intra-péritonéale, en solution aqueuse à 20p100, les meilleurs résultats ayant été obtenus avec la dose de 1,25 g/kg. On peut admettre, dans une certaine mesure, que les animaux se trouvent dans un nouvel état basal stabilisé qui permet alors l'étude de l'incorporation dans des conditions aussi semblables que possible pour les différents rats en expérience.

4- Sacrifice

La durée d'incorporation, dont l'étude sera envisagée à la fin de ce sous-chapitre, doit être parfaitement définie et la même pour tous les rats en expérience. Il est donc nécessaire non seulement d'injecter le traceur à un temps bien déterminé, mais encore de procéder au sacrifice des animaux à un temps également très précis. Ceci est obtenu en les saignant par ponction de l'aorte abdominale avec une seringue en polypropylène à usage unique de 10 ml munie d'une aiguille de 1mm de section.

L'abord chirurgical de l'aorte abdominale est relativement aisé puisqu'il faut moins de deux minutes pour ouvrir la cavité abdominale, dégager puis isoler l'aorte et y introduire l'aiguille afin de réaliser la saignée de l'animal.

B- PROBLEMES D'ORDRE TECHNIQUE

Le premier problème strictement technique qui s'est posé à nous a été celui de l'isolement des β -lipoprotéines sériques et tissulaires.

1- Isolement des β -lipoprotéines

Nous comptions initialement nous inspirer d'un travail expérimental de deux chercheurs italiens : ALBANO & FRANCAVILLA, qui avaient étudié la synthèse hépatique des β -lipoprotéines chez le rat intoxiqué par le tétrachlorure de carbone (5, 6). Ces deux auteurs mesuraient l'incorporation, pendant une heure, de la L-leucine ^{14}C -4 et de l'acide palmitique ^3H -9-10 dans les β -lipoprotéines du sérum et de la fraction soluble du tissu hépatique. Ces lipoprotéines étaient obtenues par précipitation par le phosphotungstate de sodium en présence de chlorure de magnésium selon la méthode de BURSTEIN pour le sérum (71) et par une modification de ce procédé proposée par ces deux chercheurs pour le foie.

Si cette méthode d'isolement s'est révélée satisfaisante à partir du sérum, comme nous l'avons déjà signalé dans la troisième partie (Matériel et méthodes), il n'en est pas du tout de même dans le cas du foie, malgré des essais initiaux ayant paru favorables.

La méthode d'ALBANO & FRANCAVILLA nous avait en effet permis d'obtenir des " β -lipoprotéines hépatiques" pures dont la vitesse de migration électrophorétique en veine liquide et en gradient de saccharose était voisine de celle des β -lipoprotéines sériques. Mais leur analyse biochimique devait nous révéler leur nature très peu lipoprotéique puisqu'elles ne contiennent qu'une très faible quantité de lipides (5p100 environ), les principales fractions (triglycérides, cholestérol libre et ses esters, phospholipides) étant cependant toutes représentées, comme l'a montré l'analyse chromatographique en couche mince.

D'autre part, si ces " β -lipoprotéines hépatiques" incorporent bien de la glycine ^{14}C -1 et de la L-leucine ^{14}C , elles n'incorporent pratiquement pas d'acide palmitique ^3H -9-10, à la différence des β -lipoprotéines sériques et contrairement à ce qu'indiquent ALBANO & FRANCAVILLA. Nous l'avons constaté aussi bien chez des rats témoins que chez des animaux intoxiqués par le phosphore blanc à la dose de 10 mg/kg pendant cinq heures, ce dernier délai ayant été choisi pour avoir un point de comparaison avec ces deux auteurs. L'augmentation de la dose d'acide palmitique tritié et l'utilisation du complexe palmitate de sodium-albumine ont été sans effet sur l'incorporation de ce traceur dans les " β -lipoprotéines hépatiques" qui demeure pratiquement nulle.

Mais il est possible que le délai d'incorporation utilisé (une heure), s'il convient très bien pour étudier le renouvellement de la copule protidique de ces " β -lipoprotéines hépatiques", soit trop long pour l'étude de leur copule lipidique. Nous y reviendrons à la fin de ce sous-chapitre.

De toute façon il nous est apparu, à la réflexion, que les expériences de double marquage, peut-être très séduisantes au point de vue théorique, entraînent un certain nombre de difficultés pratiques et présentent notamment l'inconvénient de nécessiter une diminution du rendement pour le comptage du tritium. Or c'est ce dernier qui nous intéresse le plus puisque nous voulons également étudier le renouvellement des lipides hépatiques en suivant l'incorporation de l'acide palmitique tritié.

D'autre part, le mode d'expression des résultats utilisé par ALBANO & FRANCAVILLA (CPM pour 100 mg de foie ou 1 ml de sérum) nous apparaît ~~fort~~ peu rigoureux car il fait abstraction d'une éventuelle variation des composés dont on se propose justement de mesurer le renouvellement.

Il résulte de ces différentes remarques qu'il est sans doute préférable de n'utiliser qu'un seul traceur : le palmitate tritié lié à l'albumine et de faire une étude cinétique préliminaire de son incorporation dans les lipides du foie et dans les β -lipoprotéines sériques et hépatiques. Nous la décrirons un peu plus loin.

2- Comptage des β -lipoprotéines et des lipides hépatiques

Les problèmes relatifs au comptage des lipides hépatiques et des β -lipoprotéines ont déjà été envisagés dans le second chapitre de la troisième partie (Matériel et méthodes). Nous allons d'ailleurs avoir l'occasion de revenir plus particulièrement sur ceux relatifs aux β -lipoprotéines lors de l'étude du délai d'incorporation du palmitate tritié que nous allons aborder maintenant.

C- ETUDE DE LA DUREE D'INCORPORATION DE L'ACIDE PALMITIQUE TRITIE

1- Protocole

Nous avons injecté, dans la veine du pénis, 10 microcuries de palmitate de sodium ^3H -9-10 lié à l'albumine à des rats soumis à un jeûne portant uniquement sur la nourriture solide depuis dix-huit heures et préalablement anesthésiés à l'uréthane (1,25 g/kg par voie intrapéritonéale). Le sacrifice des animaux est réalisé en les saignant par ponction de l'aorte abdominale 10, 20, 30 et 40 minutes après l'injection du traceur. Quatre rats sont utilisés pour chacun de ces quatre temps.

La radioactivité est mesurée :

- sur les β -lipoprotéines sériques et "hépatiques" qui sont comptées sur disques Whatman GF/C,
- sur les lipides totaux et sur les triglycérides hépatiques séparés par chromatographie en couche mince.

2- Résultats

Au cours de cet essai nous n'avons pas déterminé le "quenching" des différents échantillons, aussi nous contenterons-nous, afin d'éviter toute confusion avec les données numériques obtenues dans l'expérimentation définitive, d'indiquer seulement l'évolution de la radioactivité dans les différents paramètres mesurés, sans donner de valeur chiffrée.

Les déterminations de radioactivité ont tout d'abord montré que les " β -lipoprotéines hépatiques" n'incorporaient pratiquement pas de palmitate marqué quelque soit le délai.

Par contre, l'incorporation du traceur dans les β -lipoprotéines sériques croît rapidement entre les dixième et trentième minutes et semble maximale au bout de quarante minutes. Ce délai est plus tardif que celui observé par BAKER & SCHOTZ (30 minutes) pour les triglycérides sériques (17).

Enfin, l'incorporation du palmitate marqué dans les lipides totaux et les triglycérides hépatiques, déjà importante à la dixième minute, paraît maximale à la vingtième minute et décroît lentement ensuite.

3- Discussion

a- Les " β -lipoprotéines hépatiques" isolées selon la méthode d'ALBANO & FRANCAVILLA (5, 6) paraissent définitivement ne pas correspondre à de véritables β -lipoprotéines. En effet, elles ne contiennent que 5p100 de lipides, dont très peu de triglycérides (moins de 1p100), et n'incorporent pas d'acide palmitique tritié. Il faut noter que les deux critères utilisés par ces auteurs pour contrôler la nature de ces molécules sont la disparition de la bande correspondante aux β -lipoprotéines en électrophorèse, et l'identité d'incorporation de la leucine et de l'acide palmitique

marqués par ces composés isolés directement sur le surnageant cellulaire et par les fractions lipoprotéiques VLD et LD obtenues par ultracentrifugation. Mais, par contre, ces deux chercheurs n'ont procédé à aucune analyse biochimique de leurs constituants.

Il n'est donc pas possible d'utiliser un matériel biologique aussi suspect dans la suite de nos expériences.

On peut penser, d'autre part, que le problème des lipoprotéines hépatiques est sans doute beaucoup plus complexe que ne l'ont supposé ALBANO & FRANCAVILLA et que leur isolement est certainement beaucoup plus difficile. D'ailleurs la biochimie des lipoprotéines tissulaires n'est, à l'heure actuelle, qu'au début de son développement et les conceptions ne sont pas suffisamment bien définies dans ce domaine pour que l'on puisse explorer une telle voie dans une étude de ce type.

- b- Les résultats de cette étude préliminaire nous conduisent à choisir, comme durée d'incorporation du palmitate tritié, le temps de trente minutes qui est intermédiaire entre les deux maximum d'incorporation du traceur dans les triglycérides hépatiques d'une part (vingt minutes) et dans les β -lipoprotéines sériques d'autre part (quarante minutes).
- c- Pour augmenter la sensibilité des mesures radioactives, c'est-à-dire le nombre de CPM à compter dans les divers échantillons, il est préférable d'injecter une quantité plus importante de traceur qui sera de l'ordre de 20 microcuries.
- d- Afin de comparer les résultats d'incorporation dans des constituants biologiques distincts (lipides hépatiques et β -lipoprotéines sériques), il est indispensable de tenir compte du "quenching" des

différents échantillons.

S'il est facilement déterminable dans le cas des lipides hépatiques il n'en est pas de même dans le cas des β -lipoprotéines sériques en raison de l'utilisation des disques pour réaliser leur comptage. C'est la raison pour laquelle nous les avons abandonnés pour utiliser le soluène-100 (Packard) qui présente, en outre, le double avantage de permettre l'introduction d'un volume limité de phase aqueuse (10 % du volume de soluène) et la solubilisation des lipoprotéines.

Cette mise au point, que nous venons de résumer, s'est ainsi révélée beaucoup plus complexe, beaucoup plus laborieuse et beaucoup plus longue que ne l'avaient laissé prévoir les travaux d'ALBANO & FRANCAVILLA puisqu'il ne nous a pas fallu moins de neuf mois pour arriver à définir les conditions finales d'utilisation du traceur, l'acide palmitique ^3H -9-10 sous forme de sel de sodium lié à l'albumine, ainsi que les conditions de préparation et de comptage des différents échantillons. Ces protocoles ont été décrits dans le second chapitre de la troisième partie (Matériel et méthodes).

Un seul problème demeure encore en suspens, c'est celui relatif à la durée d'intoxication.

S'il se produit un trouble de l'incorporation du palmitate tritié dans les lipides hépatiques et les β -lipoprotéines sériques qui permet d'expliquer la stéatose phosphorée, il est logique de penser que celui-ci doit se produire avant l'apparition de la surcharge du foie en triglycérides. Il convient donc d'étudier l'incorporation du traceur avant que ne se manifeste la stéatose, donc à la douzième heure, et de la suivre pendant son

développement initial, c'est-à-dire à la quinzième heure où elle est encore relativement modérée et à la vingt-quatrième heure où elle est déjà assez nettement affirmée.

Nous pouvons décrire, maintenant, les différentes expériences d'incorporation que nous avons effectuées chez les rats intoxiqués par le phosphore blanc.

II- EXPERIMENTATION DEFINITIVE

A- PROTOCOLE

Nous avons donc pratiqué une injection sous-cutanée du toxique à la dose de 10 mg/kg à des rats. Les durées successives d'intoxication sont les suivantes :

12 heures
15 heures
24 heures.

Pour chacune de ces trois expériences, cinq rats servent de témoins et cinq autres reçoivent le phosphore blanc. Tous sont soumis à un jeûne portant uniquement sur la nourriture solide dix-huit heures avant le sacrifice. Celui-ci est effectué en saignant les animaux par l'aorte abdominale quarante cinq minutes après l'anesthésie à l'uréthane (1,25g/kg en intrapéritonéale) et trente minutes après l'injection, dans la veine du pénis, du traceur (acide palmitique ^3H -9-10 sous forme de sel de sodium lié à l'albumine) aux doses suivantes :

19,15 μC pour l'expérience sur 12 heures,
19,95 μC pour l'expérience sur 15 heures,
18,09 μC pour l'expérience sur 24 heures.

Les foies sont prélevés et on réalise un bilan lipidique et une mesure de la radioactivité :

- sur la "graisse flottante" recueillie par centrifugation des homogénats dans du soluté isotonique de chlorure de sodium, puis lavages répétés et

extraction par du chloroforme ; il faut noter que cette méthode de préparation ne permet pas une récupération quantitative de la "graisse flottante" et que l'on ne peut déterminer, dans son cas, que l'activité spécifique et pas l'activité totale,

- sur l'extrait lipidique total,
- sur les triglycérides et les phospholipides séparés par chromatographie en couche mince.

Sur les sérums, on effectue un dosage des triglycérides et une mesure de la radioactivité des β -lipoprotéines (VLDL et LDL) isolées par précipitation.

B- RESULTATS

Il nous faut tout d'abord signaler que si la dose de phosphore blanc de 10mg/kg a été bien supportée jusqu'à la quinzième heure, un des cinq rats intoxiqués lors de l'expérience sur vingt quatre heures est mort avant ce délai ; les moyennes arithmétiques correspondant à cet essai ont donc été calculées sur les quatre animaux sacrifiés. Nous retrouvons, d'autre part, l'augmentation significative déjà observée lors des précédentes expériences pour le poids du foie et le rapport F/C aux douzième ($p < 0,05$), quinzième, ($p < 0,01$) et vingt-quatrième heures ($p < 0,01$).

1- Action sur les lipides hépatiques et les triglycérides sériques

Les résultats sont indiqués dans le tableau 12.

a- Lipides totaux et triglycérides hépatiques

Si l'on ne note pas de variation significative de ces deux paramètres au bout de douze heures, un des cinq rats intoxiqués présente cependant des valeurs élevées de lipides totaux (62,2mg/g) et de triglycérides (24,2mg/g).

A la quinzième et à la vingt-quatrième heures, ces deux paramètres sont augmentés de façon très significative.

Durée de l'intoxication	Lipides Hépatiques (mg/g)				Triglycérides sériques (g/l)	
	L. T.	T. G.	C. T.	P. L.		
12 Heures	Témoins	50,3 ± 2,9	12,1 ± 2,3	2,27 ± 0,15	31,8 ± 1,7	0,65 ± 0,16
	Intoxiqués	54,8 ± 7,2	15,4 ± 6,6	2,02 ± 0,03	34,4 ± 3,1	0,85 ± 0,19
	Valeur de p	N. S.	N. S.	< 0,01	N. S.	N. S.
15 Heures	Témoins	47,4 ± 3,5	8,56 ± 2,17	2,38 ± 0,19	31,9 ± 2,1	0,58 ± 0,18
	Intoxiqués	62,1 ± 2,6	21,6 ± 2,19	2,26 ± 0,15	33,4 ± 1,3	0,43 ± 0,13
	Valeur de p	< 0,001	< 0,001	N. S.	N. S.	N. S.
24 Heures	Témoins	52,5 ± 2,6	11,9 ± 3,0	2,33 ± 0,09	32,4 ± 1,3	0,81 ± 0,24
	Intoxiqués	69,1 ± 6,2	30,0 ± 5,9	2,42 ± 0,13	31,5 ± 1,4	0,45 ± 0,21
	Valeur de p	< 0,001	< 0,001	N. S.	N. S.	< 0,05

TABEAU 12

Action du **phosphore blanc** (10mg/kg en S.C.) sur les lipides hépatiques et les triglycérides sériques des rats anesthésiés à l'uréthane (1,25 g/kg en I.P. pendant 45 minutes)

Un fait est particulièrement important à signaler : la pellicule lipidique qui surnage après centrifugation des homogénats de foie dans le soluté isotonique de chlorure de sodium ("graisse flottante") est d'autant plus importante que la concentration de l'organe en triglycérides est élevée.

L'analyse chromatographique a montré que cette "graisse flottante" était constituée par des triglycérides à l'état pur ("TG libres").

b- Cholestérol total et phospholipides hépatiques

La seule variation significative observée dans le cas de ces deux constituants lipidiques est une faible diminution du cholestérol total au bout de douze heures.

c- Triglycérides sériques

La triglycéridémie est diminuée de façon significative après vingt quatre heures. Il faut remarquer cependant que les triglycérides sériques des animaux intoxiqués sont légèrement plus bas à la quinzième heure qu'à la vingt-quatrième heure mais ils ne diffèrent pas significativement de ceux des témoins.

2- Action sur l'incorporation du palmitate tritié dans les lipides hépatiques

Rappelons tout d'abord, que l'activité spécifique (A.S.) représente le pourcentage de la dose injectée par milligramme du paramètre biologique considéré et normalisé à 100 grammes de poids corporel, l'activité totale (A.T.) représentant le pourcentage de la dose injectée dans la quantité totale de ce paramètre (17). Les résultats sont portés au tableau 13.

a- Lipides totaux

L'activité spécifique des lipides totaux ne montre pas de variation

Durée de l'intoxication	Lipides totaux		Triglycérides totaux		"TG. libres"		Phospholipides	
	A. S.	A. T.	A. S.	A. T.	A. S.	A. T.	A. S.	A. T.
12 Heures	Témoins	0,162±0,030	19,78±2,29	0,239±0,033	7,02±0,77	0,119±0,050	0,030±0,007	2,28±0,43
	Intoxiqués	0,133±0,021	22,12±3,99	0,214±0,079	8,89±1,77	0,146±0,032	0,027±0,006	2,93±0,82
	Valeur de p	N. S.	N. S.	N. S.	N. S.	N. S.	N. S.	N. S.
15 Heures	Témoins	0,120±0,018	14,91±1,69	0,232±0,086	4,82±0,78	0,124±0,019	0,021±0,003	1,76±0,31
	Intoxiqués	0,117±0,010	23,06±2,15	0,151±0,019	10,35±1,02	0,119±0,016	0,022±0,003	2,35±0,22
	Valeur de p	N. S.	< 0,001	N. S.	< 0,001	N. S.	N. S.	< 0,01
24 Heures	Témoins	0,124±0,022	18,48±3,06	0,225±0,064	7,31±1,59	0,074±0,042	0,025±0,005	2,29±0,32
	Intoxiqués	0,104±0,055	25,72±2,43	0,120±0,010	12,78±1,36	0,074±0,018	0,028±0,003	3,19±0,46
	Valeur de p	N. S.	< 0,01	< 0,02	< 0,001	N. S.	N. S.	< 0,02

TABLEAU 13

Action du phosphore blanc (10mg/kg en S.C.) sur l'incorporation de l'acide palmitique ³H-9-10 dans les lipides hépatiques du rat.

statistiquement significative ; elle tend cependant à être abaissée chez les animaux intoxiqués, notamment à la douzième heure.

L'activité totale augmente, par contre, régulièrement : si à la douzième heure l'augmentation n'est pas encore significative, elle l'est aux quinzième et vingt-quatrième heures. La signification plus élevée à quinze heures qu'à vingt-quatre heures, bien que l'activité totale soit inférieure, est due à la valeur moyenne plus faible des témoins de l'expérience sur quinze heures.

b- Triglycérides

L'activité spécifique des triglycérides totaux diminue régulièrement mais la variation n'est significative qu'à la vingt-quatrième heure. Leur activité totale est, par contre, augmentée très significativement dès la quinzième heure.

L'activité spécifique des "TG libres" ne subit pas de modification. Notons, dès maintenant, qu'elle est environ deux fois plus faible que celle des triglycérides totaux chez les témoins. La différence s'atténue à mesure que l'intoxication se prolonge.

c- Phospholipides

Si l'activité spécifique des phospholipides ne montre pas de variation appréciable, leur activité totale est augmentée de façon significative à partir de la quinzième heure.

3- Action sur l'incorporation du palmitate tritié dans les β -lipoprotéines sériques

Les résultats sont indiqués dans le tableau 14.

Durée de l'intoxication		β -Lipoprotéines		Sériques
		A. S.	A. T.	
12 Heures	Témoins	1,071 $\pm$ 0,217	1,726 $\pm$ 0,467	
	Intoxiqués	0,815 $\pm$ 0,176	1,644 $\pm$ 0,633	
	Valeur de p	N. S.	N. S.	
15 Heures	Témoins	0,769 $\pm$ 0,158	1,028 $\pm$ 0,772	
	Intoxiqués	0,627 $\pm$ 0,137	0,678 $\pm$ 0,297	
	Valeur de p	N. S.	N. S.	
24 Heures	Témoins	1,011 $\pm$ 0,129	1,928 $\pm$ 1,275	
	Intoxiqués	0,348 $\pm$ 0,264	0,415 $\pm$ 0,564	
	Valeur de p	$< 0,01$	0,05 $< p < 0,10$	

TABLEAU 14

Action du phosphore blanc (10mg/kg en S.C.) sur l'incorporation de l'acide palmitique $^3\text{H-9-10}$ dans les β -lipoprotéines sériques du rat.

L'activité spécifique des β -lipoprotéines sériques subit une diminution régulière mais qui ne devient significative qu'au bout de vingt-quatre heures où elle représente, chez les rats intoxiqués, environ le tiers de celle des témoins. Notons que si la variation par rapport aux témoins est peu nette à la quinzième heure, cela semble surtout dû au fait que la valeur pour ceux-ci paraît basse comparée à celle des témoins des deux autres séries d'essai (douze et vingt-quatre heures).

L'activité totale, qui est normale à la douzième heure, subit ensuite une diminution régulière. Si celle-ci n'est statistiquement significative à la vingt-quatrième heure qu'au seuil de $0,05 < p < 0,10$, par suite de la variance très élevée de la distribution des témoins, elle est cependant très importante puisque l'activité totale des rats intoxiqués ne représente plus que le quart de celle des témoins. D'ailleurs, si l'on effectue le calcul de la moyenne arithmétique des témoins sans tenir compte du principal responsable de la dispersion élevée ($A.S. = 4,095$), on obtient une moyenne et un écart-type plus bas ($1,386 \pm 0,458$); la diminution de l'activité totale chez les intoxiqués devient alors plus significative ($p < 0,05$), malgré cette moyenne moins élevée des témoins.

Il est particulièrement important de noter que les activités spécifique et totale les plus basses (respectivement 0,156 et 0,067) sont enregistrées, à la vingt-quatrième heure, chez le rat présentant la stéatose hépatique la plus importante (38,8mg de triglycérides par gramme de foie).

C- DISCUSSION

1- Action sur les lipides hépatiques et les triglycérides sériques

La modification des conditions expérimentales utilisées jusqu'ici, c'est-à-dire l'anesthésie à l'uréthane, modifie-t-elle l'allure générale des phénomènes observés ?

- a- Nous avons déjà indiqué, dans les résultats, qu'il n'en était rien en ce qui concernait le poids du foie et le rapport F/C.
- b- L'augmentation des lipides totaux hépatiques est plus précoce que celle observée précédemment (cf. tableau 11b), puisqu'elle est très significative dès la quinzième heure. La concentration en lipides totaux à la vingt-quatrième heure est, par contre, moins élevée que celle trouvée antérieurement (cf. tableau 5a).
- c- Les triglycérides hépatiques sont augmentés très significativement dès la quinzième heure comme nous l'avons déjà constaté ; ce sont ces composés qui sont les principaux responsables de l'augmentation des lipides totaux. Les concentrations trouvées pour les triglycérides sont voisines (15 heures) ou moins élevées (vingt-quatre heures) que celles enregistrées au cours des expériences précédentes (cf. tableaux 5a et 11b).
- d- Les variations du cholestérol total et des phospholipides sont toujours de faible ampleur.
- e- La triglycéridémie n'est abaissée significativement qu'à la vingt-quatrième heure, comme nous l'avons déjà mis en évidence, mais nous avons souligné, dans les résultats, la tendance à la diminution dès la quinzième heure.

Au total, nous retrouvons donc la même évolution générale que celle relevée lors des intoxications réalisées antérieurement, c'est-à-dire la formation d'une stéatose hépatique "vraie" à triglycérides. Les différences observées par rapport aux expériences précédentes, qui sont peu importantes,

doivent être vraisemblablement mises davantage sur le compte d'une variabilité entre lots d'animaux que sur celui de l'anesthésie.

Nous avons d'ailleurs déjà souligné à plusieurs reprises, la variabilité de la réponse des animaux au début de l'intoxication (jusqu'à la dix-huitième heure). A la vingt-quatrième heure, délai à la suite duquel la stéatose est plus évidente, les résultats obtenus au cours de cette expérimentation sont très superposables à ceux enregistrés initialement.

Quant à l'incidence de l'injection du palmitate tritié, il est bien évident que la dose traceuse utilisée, qui est de l'ordre de 40 microgrammes compte tenu de la surcharge en acide palmitique "froid" (cf. matériel et méthodes), ne peut avoir d'effet quantitatif sur la concentration des différents constituants lipidiques hépatiques ou sériques.

Ces constatations constituent une justification a posteriori du protocole que nous avons choisi pour l'étude de l'incorporation de l'acide palmitique tritié chez le rat intoxiqué par le phosphore blanc.

2- Action sur l'incorporation du palmitate tritié dans les lipides hépatiques et les β -lipoprotéines sériques

a- Le fait que l'activité spécifique des lipides totaux hépatiques ne subisse pas de variation significative paraît indiquer que la captation par le foie de l'acide palmitique tritié injecté, et donc celle des acides gras non estérifiés circulants, n'est pas modifiée sous l'action du phosphore blanc. La légère diminution de cette activité spécifique observée à la douzième heure est à rapprocher de celle de la concentration des acides gras et du glycérol plasmatiques que nous avons mise en évidence au cours d'expériences précédentes (cf. tableau 11b).

Les résultats obtenus grâce à l'injection d'acide palmitique tritié confirment donc ceux enregistrés au cours de l'étude cinétique de la mobilisation des lipides de réserve.

En conséquence nous pouvons affirmer, et ceci constitue une donnée extrêmement importante, que le phosphore blanc ne provoque pas de stimulation de la lipolyse au niveau du tissu adipeux. Ainsi la formation de la stéatose hépatique phosphorée ne peut être attribuée à une augmentation de la mobilisation des triglycérides de réserve du tissu adipeux vers le foie.

L'augmentation de l'activité totale des lipides totaux peut paraître paradoxale ; nous y reviendrons ultérieurement.

- b- Nous avons vu que, chez les animaux témoins, l'activité spécifique des "TG libres" hépatiques était plus basse que celle des triglycérides totaux. Ces données illustrent bien le fait qu'il existe au moins deux "pools" de triglycérides dans le foie (368, 48, 207, 17) :
- un premier à renouvellement lent constitué par ces "TG libres" ("graisse flottante"),
 - un second à renouvellement rapide, associé au reticulum endoplasmique (microsomes) au niveau duquel s'effectue l'estérification des acides gras ;
- c'est ce "pool métabolique" qui est le précurseur des triglycérides plasmatiques (368, 17).

Cette différence entre les activités spécifiques des triglycérides totaux et des "TG libres" est moins importante chez les rats intoxiqués.

Nous verrons plus loin quelle interprétation on peut donner de ce fait.

- c- La diminution régulière de l'activité spécifique des triglycérides hépatiques paraît refléter une atteinte progressive du processus d'estérification conduisant à ces molécules. En effet, la captation des acides gras par le foie étant sensiblement normale, puisque l'incorporation du palmitate tritié dans les lipides totaux n'est pas modifiée, la diminution de l'incorporation de ce traceur dans les triglycérides ne semble pouvoir être attribuée qu'à un abaissement de l'intensité de leur synthèse. De plus, le fait que l'activité spécifique des triglycérides totaux hépatiques se rapproche de celle des "TG libres", qui constituent le "pool" à renouvellement lent, renforce cette interprétation.

C'est dans ce dernier, rappelons-le, que se produit l'accumulation des triglycérides provoquée par le toxique : il constitue ainsi un véritable "pool de stockage".

Le déficit de la synthèse des triglycérides nous semble d'autant moins surprenant que GANOTE & OTIS (169) ont montré, dans une étude très récente au microscope électronique que le reticulum endoplasmique, site de cette biosynthèse des triglycérides, était la première ultrastructure modifiée à la suite de l'administration du phosphore blanc. D'autre part, en 1969 GHOSHAL, PORTA & HARTROFT (176) ont envisagé que la synthèse des triglycérides pouvait être altérée dans l'intoxication phosphorée. Nos résultats apportent un support concret à leur hypothèse.

Ainsi, au cours de la stéatose phosphorée, il se produit non pas une stimulation de la synthèse hépatique des triglycérides mais au contraire un ralentissement de celle-ci. Cette constatation renforce les arguments que nous avons avancés, à la suite de l'étude

du développement de la stéatose, pour expliquer l'absence d'augmentation de la synthèse intrahépatique des triglycérides. On assiste, de plus, à une véritable déviation de ces molécules vers un compartiment métaboliquement peu actif.

- d- La synthèse des phospholipides hépatiques paraît peu touchée par le phosphore blanc puisque l'activité spécifique de ces molécules reste constante au cours de l'intoxication. Cette donnée rejoint les observations de SEAKINS & ROBINSON (352) qui n'avaient pas trouvé de variation de l'incorporation de l'orthophosphate marqué au ^{32}P dans les phospholipides hépatiques des rats ayant reçu ce toxique par voie orale.

Une éventuelle modification de la synthèse hépatique des phospholipides ne semble donc pas devoir être invoquée dans la pathogénèse de la stéatose phosphorée.

- e- Comment alors expliquer l'augmentation de l'activité totale des triglycérides hépatiques qui est la principale responsable de celle des lipides totaux ? Si cette augmentation de l'activité totale des triglycérides hépatiques, qui traduit leur accumulation dans le foie, n'est pas due à une synthèse accrue de ces molécules à partir de leurs précurseurs intra ou extra-hépatiques (acides gras et glycérol), elle ne peut plus alors résulter que d'un trouble de la sécrétion des triglycérides du foie dans la circulation générale.

Ce défaut d'excrétion a déjà été envisagé par LOMBARDI & RECKNAGEL (258) qui avaient constaté une inhibition par le phosphore blanc de l'hypertriglycémie induite par le Triton, détergent non ionique qui possède la propriété de bloquer l'utilisation des triglycérides plasmatiques. Et de fait, les résultats de nos expériences

montrent que l'activité spécifique et l'activité totale des β -lipoprotéines sériques, qui constituent la principale forme de transport des triglycérides sécrétés par le foie, sont diminuées de façon importante à la vingt-quatrième heure.

L'apparition de ce blocage de l'excrétion de ces molécules semble être progressive puisque la diminution de l'activité spécifique des β -lipoprotéines sériques semble assez régulière et devient très significative à la vingt-quatrième heure. Leur activité totale suit une évolution parallèle que l'on peut même estimer plus nette bien que la signification statistique de son abaissement à ce même temps soit moins grande que celle de leur activité spécifique.

La diminution de l'incorporation de l'acide palmitique tritié dans les β -lipoprotéines sériques, que nous venons de mettre en évidence, est à rapprocher de celle de la DL- ($1-^{14}\text{C}$) leucine dans les lipoprotéines sériques de rats intoxiqués par le phosphore blanc qu'avait trouvée SEAKINS & ROBINSON (352) en utilisant des conditions expérimentales différentes.

Ainsi le phosphore blanc provoque un blocage de la voie d'utilisation principale des triglycérides hépatiques c'est-à-dire leur sécrétion dans le plasma sous forme de β -lipoprotéines, ce qui entraîne une double conséquence : d'une part l'accumulation de ces triglycérides dans le foie et d'autre part leur diminution dans le plasma. C'est ce mécanisme qui paraît devoir constituer la cause unique de la stéatose hépatique provoquée par ce toxique.

f- C'est très vraisemblablement à un défaut partiel de leur sécrétion dans le plasma que l'on doit attribuer, également, l'augmentation de l'activité totale des phospholipides hépatiques, qui est nettement

moins importante que dans le cas des triglycérides, d'autant que nous avons déjà montré que la phospholipidémie était abaissée sous l'action du phosphore blanc (cf. tableaux 8a , 8b, et figure VIII).

- g- Il n'est pas exclu que l'on puisse invoquer un tel mécanisme pour expliquer aussi la chute de la cholestérolémie que nous avons mise en évidence au cours de ces mêmes expériences précédentes. Comment se fait-il alors que l'on n'observe pas d'augmentation de la concentration hépatique en phospholipides et en cholestérol? A l'inverse des triglycérides, il faut rappeler que leur sécrétion à partir du foie, dans le plasma, ne constitue pas la seule voie d'utilisation de ces composés; il est très possible que, sous l'action du phosphore blanc, il se produise une augmentation de leur sécrétion dans la bile qui aurait pour effet de maintenir sensiblement constante leur concentration hépatique.
- h- Le blocage, par des doses toxiques de phosphore blanc (10 mg/kg), de la capacité hépatique d'excrétion des triglycérides, et d'une façon plus générale des lipides, est-il temporaire ou définitif ? Des considérations de deux ordres permettent de penser qu'il est vraisemblablement transitoire.
 - α - d'une part, le caractère réversible de la stéatose hépatique est bien connu à condition que l'atteinte hépatique ne soit pas trop importante (227, 331),
 - β - d'autre part, nous avons déjà signalé lors de l'étude du développement de la stéatose phosphorée que la chute des différents constituants lipidiques sériques, qui est maximale à la trente-sixième heure, faisait place ensuite à une augmentation rapide du cholestérol total et surtout des phospholipides , mais beaucoup plus lente des triglycérides. On peut penser que ce phénomène traduit une récupération progressive de la capacité du foie d'excréter les lipides dans le plasma.

Comment alors interpréter cette remontée inégale des différentes classes de lipides plasmatiques ? Deux hypothèses principales peuvent être formulées :

- on peut imaginer que la formation des diverses lipoprotéines (VLDL, LDL, HDL) n'est pas également entravée et que notamment celle des lipoprotéines de très basse densité (VLDL) - vecteur majeur des triglycérides plasmatiques - est la plus affectée,
- il est possible aussi que la formation des diverses lipoprotéines soit également empêchée initialement. La reprise de la sécrétion pourrait ne concerner que certaines d'entre elles, HDL en particulier, en raison de l'utilisation préférentielle, pour leur biosynthèse, de certains peptides communs aux VLDL et aux HDL (357).

De toute façon, dans le cas du cholestérol total et des phospholipides, on peut penser qu'il se surajoute un processus pathologique secondaire (hépatite, rétention, etc....?) qui contribue à leur augmentation si manifeste à partir des trente-sixième et quarante-huitième heures.

Mais comment expliquer, dans le cas d'une reprise de l'excrétion hépatique des triglycérides, que ces derniers continuent à augmenter, bien que lentement, dans le foie après la trente-sixième heure (cf. tableau 5b et figure VII)? Il est possible que cela résulte d'une amélioration particulièrement lente de cette fonction en raison de la gravité initiale de l'atteinte du potentiel de biosynthèse des lipoprotéines. La libération des triglycérides dans le plasma demeurerait donc toujours inférieure à leur production jusqu'à la mort des animaux puisque nous n'avons pas constaté de survie avec la dose de 10 mg/kg au delà de la quatre-vingt-seizième heure. De toute façon cette récupération de la capacité hépatique d'excrétion des triglycérides, si elle se produit, n'influe pas sur le pronostic, car l'atteinte des autres fonctions du foie est sans doute alors irréversible.

*

*

*

La mise en évidence du mécanisme biochimique de la stéatose hépatique induite par le phosphore blanc, qui consiste essentiellement dans le blocage de la sécrétion des triglycérides du foie dans la circulation générale, nous conduit à nous demander quelle peut en être la raison.

- 1- On peut, tout d'abord, supposer que le toxique provoque une atteinte de la membrane cellulaire. Cependant, le fait que la biosynthèse des phospholipides, qui sont des constituants fondamentaux de la membrane, ne soit pas touchée rend cette hypothèse peu probable.
- 2- On peut, plutôt, concevoir que l'administration de phosphore blanc entraîne un défaut de synthèse des β -lipoprotéines puisque celles-ci représentent la principale forme de transport des triglycérides. De fait, BARKER & Coll. (22) d'une part, SEAKINS & ROBINSON (352) d'autre part, ont trouvé une diminution de l'incorporation de la valine tritiée (22) et de la DL-1-¹⁴C Leucine (352) dans les protéines hépatiques de rats intoxiqués par le phosphore blanc. SEAKINS & ROBINSON ont, de plus, observé une baisse de l'incorporation de la DL leucine dans les lipoprotéines sériques, que nous avons déjà rapprochée de la diminution de l'incorporation du palmitate tritié que nous avons mise en évidence dans les β -lipoprotéines sériques.

C'est très certainement vers l'étude des molécules de ce type qu'il convient de s'orienter pour approfondir encore davantage ce mécanisme biochimique de la stéatose phosphorée. Mais cette voie de recherche est extrêmement difficile car elle implique l'abord d'un problème infiniment complexe, celui de la biosynthèse des lipoprotéines dont les modalités sont loin d'être définies avec précision. Ce que l'on peut à l'heure actuelle avancer est résumé dans le schéma que nous avons indiqué précédemment (cf. page 56), qui nous permet d'imaginer un certain nombre de points d'attaque :

- soit une action au niveau des acides nucléiques (DNA, RNA messenger, RNA de transfert), mais il faut noter que le noyau de la cellule n'est touché qu'à un stade tardif de l'intoxication (169),

- soit un blocage de la synthèse de chaînes de peptides précurseurs des apoprotéines des lipoprotéines.
- soit une inhibition de la conjugaison de ces peptides qui conduit aux apoprotéines,
- soit un blocage de la condensation entre les copules protidique et lipidique par action directe (au niveau d'enzymes ?) ou par suite de la formation d'apoprotéines ou de copules lipidiques anormales.

Signalons à ce sujet que très récemment, en 1969, GHOSHAL, PORTA & HARTROFT (176) ont trouvé une augmentation de la peroxydation des triglycérides microsomaux qui, d'après ces auteurs, serait la cause de l'accumulation des triglycérides dans la cellule hépatique ; un argument d'ordre thérapeutique plaiderait en faveur de cette interprétation puisque l'administration intraveineuse d'un anti-oxydant, l'ubiquinone, semble prévenir la stéatose induite par le phosphore blanc administré à dose relativement faible (3 mg/kg, par voie intrapéritonéale ,123). Il est cependant, regrettable que GHOSHAL & coll. ne relie pas leurs travaux à ceux de SEAKINS & ROBINSON (352). De toute façon, il n'est pas évident qu'un tel mécanisme puisse être responsable de l'accumulation des triglycérides au niveau du foie, cette peroxydation pouvant très bien se produire parce que la biosynthèse des lipoprotéines est inhibée.

- 3- On peut, enfin, supposer que le métabolisme énergétique est diminué au cours de l'intoxication phosphorée et que ce phénomène jouerait un rôle à l'une des étapes éventuelles de la synthèse des lipoprotéines. Cette conception a été un moment à l'honneur, notamment à la suite des travaux de DIANZANI (126, 127), et a constitué ce que l'on a appelé "l'hypothèse mitochondriale" de la stéatose. Elle a été abandonnée à la suite, notamment, des travaux de NEUBERT & MAYBAUER (288).

Ainsi, l'exploration et la mise en évidence d'un mécanisme biochimique de la stéatose phosphorée nous ont amenés à évoquer un certain nombre de questions très importantes, dont la réponse, cependant, ne pourra être fournie qu'à l'issue de recherches fondamentales sur le métabolisme des lipoprotéines tissulaires et circulantes.

Nous en sommes arrivés, pratiquement, au terme de cette étude et il est nécessaire de réunir les conclusions générales que l'on peut en tirer. Mais avant de les envisager, il nous faut indiquer les résultats des examens anatomo-pathologiques que nous avons effectués au cours de certaines expériences.

ANATOMO - PATHOLOGIE

L'examen macroscopique du foie des animaux témoins et intoxiqués par le phosphore blanc a été systématiquement effectué lors du sacrifice, comme nous l'avons déjà signalé à propos des différentes expérimentations réalisées.

Nous traiterons donc surtout ici de l'examen histologique des foies pratiqué, parallèlement à l'analyse biochimique, au début de l'intoxication c'est-à-dire trois, six, et neuf heures après l'administration du toxique (10 mg/kg) et pendant le développement de la stéatose c'est-à-dire à la vingt-quatrième et à la trente-sixième heure. En fait, cette étude ne présentait pour nous que l'intérêt assez limité d'une confirmation supplémentaire mais il n'a jamais été dans nos projets d'effectuer une recherche histologique très poussée en raison du caractère récent de certains travaux dans ce domaine (169).

A- TECHNIQUE

L'observation microscopique des coupes a été faite après fixation d'un fragment de l'organe par le liquide de BOUIN puis déshydratation à l'alcool inclusion en paraffine, section et enfin coloration à l'hématéine-éosine.

B- RESULTATS ET DISCUSSION

Jusqu'à la neuvième heure l'aspect microscopique des foies des animaux intoxiqués et des témoins ne montre pas de différence, ce qui correspond à l'examen macroscopique et aux résultats biochimiques (cf. tableau 11a et 11b).

Si, à la vingt-quatrième heure, les foies des rats intoxiqués présentaient une stéatose macroscopique d'intensité variable et des concentrations hépatiques en lipides totaux et en triglycérides assez élevées (cf. tableau 12), la stéatose de ces organes s'est révélée minime à l'examen histolo-

gique. On a pu observer, d'autre part, chez deux animaux quelques signes légers de nécrose. A la trente-sixième heure la stéatose est générale comme on pouvait s'y attendre.

En conclusion, nous n'attacherons pas une grande importance à ces données histologiques car nous avons utilisé une technique globale et nous aurions obtenu certainement de meilleurs résultats avec des colorations spécifiques et surtout un examen en microscopie électronique. Par ailleurs, cette étude n'a été faite, naturellement, que sur un fragment de foie prélevé en un seul endroit (lobe latéral gauche).

Il nous faut donc remarquer que, comme cela se produit pour d'autres intoxications, les lésions biochimiques sont plus apparentes, plus précoces et plus importantes que les lésions histologiques, surtout lorsque l'on se contente d'un examen relativement général.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Nous allons, pour conclure, dégager les résultats généraux que nous avons mis en évidence au cours de cette étude sur l'action stéatosante du phosphore blanc administré en solution huileuse à 1p100, par la voie sous-cutanée, à des rats Wistar mâles adultes.

- 1- Le phosphore blanc provoque la stéatose hépatique "vraie" c'est-à-dire une accumulation de triglycérides au niveau du foie. Elle est observée lorsque ce toxique est administré aussi bien à doses relativement faibles (2,5 et 5 mg/kg) mais répétées, qu'à une dose unique plus importante (10mg/kg).

Cette augmentation des triglycérides hépatiques peut se produire sans que ne varie la concentration du foie en lipides totaux, ce qui est le cas lors de l'administration de doses répétées (2,5 et 5 mg/kg) ou bien avant que ne se manifeste une augmentation des lipides totaux hépatiques, ce que l'on observe généralement au début de l'intoxication provoquée par l'injection de la dose unique de 10 mg/kg. Cette dernière conduit à des résultats plus reproductibles d'un animal à l'autre (malgré une certaine variabilité dans la réponse initiale des animaux à l'agression du toxique), plus nets et qui confirment exactement les tendances relevées lors des essais de répétition de doses. Ces derniers présentent cependant l'intérêt de bien mettre en évidence l'effet inhibiteur exercé par le phosphore blanc sur la croissance du rat, cette inhibition semblant d'autant plus marquée que la dose unitaire est plus élevée.

- 2- La quantité de toxique nécessaire pour provoquer de façon certaine et reproductible la stéatose représente une dose sans doute mortelle (10mg/kg) car nous n'avons pas constaté de survie au delà de la quatre-vingt seizième heure après l'intoxication.

3- L'augmentation des triglycérides hépatiques est observée dès la quinzième heure, voire même dans certains cas à la douzième heure. Elle intervient généralement avant que ne se manifeste la chute des triglycérides plasmatiques. Les autres principaux constituants lipidiques du plasma, - cholestérol total et phospholipides - sont également abaissés, leur diminution survenant avant celle des triglycérides. C'est à la trente-sixième heure que l'on constate le maximum d'effet au niveau sanguin avec, parallèlement, une stéatose hépatique déjà bien affirmée. Ce temps de trente-six heures semble ainsi représenter le moment où la stéatose "pure" est optimale car on voit apparaître, après ce délai, des signes de complication (ictère, rétention,... ?).

4- La stéatose induite par le phosphore blanc n'est pas due à une augmentation de la synthèse intra-hépatique des triglycérides. En effet, quatre arguments d'ordre expérimental nous permettent de rejeter cette première des quatre hypothèses générales qui peuvent être à priori invoquées pour expliquer la pathogénèse de la stéatose hépatique :

a- L'activité de la glucose-6-phosphate déshydrogénase ne subit pas d'augmentation sous l'action de ce toxique. Or c'est cette enzyme qui est la principale responsable de la formation du NADPH nécessaire aux deux étapes réductrices de la biosynthèse des acides gras dans la phase soluble de la cellule hépatique (cf. figures II et III). Ceci laisse supposer que cette biosynthèse n'est pas accrue, en vue de l'édification des molécules de triglycérides.

b- L'activité de la fructose 1-6-diphosphate aldolase n'est pas non plus augmentée dans les mêmes conditions. Or c'est cette enzyme qui permet la production de la phosphodihydroxyacétone qui est un des principaux précurseurs du L- α glycérophosphate qui constitue la forme métaboliquement utilisable du glycérol pour la synthèse des triglycérides (cf. figure IV).

c- La triglycéridémie est abaissée sous l'action du phosphore blanc. En effet, s'il se produisait une augmentation de la biosynthèse intra-hépatique des triglycérides, on devrait assister à leur augmentation dans le plasma, étant donné que la principale voie d'utilisation de ces molécules est leur sécrétion dans la circulation générale (17).

d- L'incorporation de l'acide palmitique tritié dans les triglycérides hépatiques (activité spécifique) diminue régulièrement ce qui traduit une atteinte progressive du processus d'estérification conduisant à leur synthèse. Rappelons que le site de celle-ci est le réticulum endoplasmique or c'est justement cette structure subcellulaire qui est la première modifiée au cours de l'intoxication par le phosphore blanc (169).

Ainsi, au cours de la stéatose phosphorée, non seulement la synthèse hépatique des triglycérides n'est pas augmentée mais elle est même diminuée.

5- Nous n'avons pas étudié une éventuelle diminution de la dégradation oxydative des acides gras qui constitue la deuxième hypothèse générale de la pathogénèse de la stéatose hépatique. En effet, cette oxydation des acides gras n'est qu'une voie mineure d'utilisation de ces molécules et quand bien même elle serait diminuée ceci ne saurait rendre compte d'une accumulation aussi importante de triglycérides (254, 256, 99).

6- La stéatose phosphorée n'est pas due à une augmentation de la mobilisation des triglycérides de réserve du tissu adipeux vers le foie (3ème hypothèse générale). Si la synthèse intra-hépatique des deux précurseurs des triglycérides hépatiques n'est pas augmentée, on pourrait penser que ces deux molécules proviennent des tissus périphériques et plus particulièrement du tissu adipeux, puisque le foie est capable de réaliser l'activation des acides gras et du glycérol nécessaire à leur incorporation dans les triglycé-

rides. Mais nous avons montré que le phosphore blanc ne provoquait pas d'augmentation de ces deux facteurs (acides gras et glycérol), qui reflètent dans le plasma l'intensité de la lipolyse au niveau du tissu adipeux.

Ces données sont confirmées par le fait que la captation des acides gras non estérifiés circulants par le foie n'est pas modifiée par l'administration du toxique puisque l'incorporation de l'acide palmitique tritié dans les lipides totaux hépatiques (activité spécifique) ne subit pas de variation significative.

7- L'apparition de la stéatose hépatique consécutive à l'administration de phosphore blanc est due à une inhibition progressive de la sécrétion par le foie des triglycérides dans le plasma sous forme de β -lipoprotéines, processus qui constitue chez l'animal normal la voie d'utilisation principale de ces molécules (17).

En effet, l'activité totale des triglycérides hépatiques après injection d'acide palmitique tritié s'élève progressivement au delà de la douzième heure, tandis qu'inversement l'incorporation du palmitate marqué dans les β -lipoprotéines sériques diminue régulièrement pour atteindre un niveau significativement très bas à la vingt-quatrième heure. Cette double variation en sens inverse traduit bien le blocage de la sécrétion des triglycérides hépatiques dans le plasma ce qui provoque l'accumulation de ces molécules dans le foie, c'est-à-dire la stéatose.

Les triglycérides hépatiques, normalement synthétisés au niveau des microsomes cellulaires pour constituer un "pool métabolique" qui s'équilibre très rapidement avec celui des triglycérides plasmatiques, sont ainsi déviés de leur destination première (libération dans le plasma) et vont s'accumuler dans un compartiment cellulaire inhabituel métaboliquement peu actif, à partir duquel ils seront beaucoup moins facilement échangeables. Ceci accroît encore la gravité de la lésion biochimique.

8- Le blocage de la sécrétion des triglycérides hépatiques n'est vraisemblablement que temporaire car, d'une part, nous avons assisté après la trente-sixième heure à une lente remontée des triglycérides plasmatiques et, d'autre part, on connaît le caractère réversible de la stéatose hépatique à condition que l'atteinte de l'organe ne soit pas trop importante (227, 331). Cependant cette récupération éventuelle de la capacité d'excrétion des triglycérides n'influe pas sur le pronostic, dans nos conditions expérimentales, car l'atteinte des autres fonctions du foie est sans doute irréversible.

9- La démonstration du mécanisme biochimique de la stéatose hépatique induite par le phosphore blanc, qui consiste essentiellement en un blocage de la sécrétion par le foie des triglycérides dans la circulation générale, nous a conduit à nous poser un certain nombre de questions concernant la synthèse des lipoprotéines tissulaires, et notamment des apoprotéines dont la conjugaison avec une copule lipidique permet l'élaboration des formes de transport des différentes classes de lipides. Les méthodes d'étude et notamment les techniques d'isolement de ces lipoprotéines tissulaires ne sont pas encore nettement définies et s'il ne nous est pas possible de trancher entre les différentes possibilités que nous avons évoquées en conclusion de la cinquième partie, l'exploration d'une telle voie doit constituer un domaine d'investigation extrêmement fécond.

Il apparaît ainsi, à travers cette étude sur la stéatose hépatique induite par le phosphore blanc, que la compréhension de tels phénomènes est impossible sans la connaissance de l'évolution permanente des conceptions biochimiques fondamentales. Celles-ci doivent guider le toxicologue dans l'exploration et la mise en évidence des mécanismes d'action des toxiques justifiant de la sorte l'originalité d'une véritable Toxicologie biochimique.

B I B L I O G R A P H I E

- 1.- ABDERHALDEN, E., BERGELL, P.

Über das Auftreten von Monoaminosäuren im Harn von Kaninchen nach Phosphorvergiftung.

Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem., 39, 464-466, (1903).

- 2.- AGOSTINI, C., PERIN, A., FONNESU, A.

Toxic fatty liver in adrenalectomized rats.

Brit. J. exp. Path., 41, 617-622, (1960).

- 3.- AILHAUD, G.P., VAGELOS, P.R.

Palmitic-acyl carrier protein as acyl donor for complex lipid biosynthesis in Escherichia Coli.

J. biol. Chem., 241, 3866-3869, (1966).

- 4.- AILHAUD, G.P., VAGELOS, P.R., GOLDFINE, H.

Involvement of ACP in acylation of glycerol-3-phosphate in Clostridium butyricum. I. Purification of Clostridium butyricum ACP and synthesis of long chain acyl derivatives of ACP.

J. biol. Chem., 242, 4459-4465, (1967).

- 5.- ALBANO, O., FRANCAVILLA, A.

Effect of CCl_4 intoxication on the synthesis of β - lipoprotein fractions in rat liver.

Clin. chim. Acta, 19, 363-366 (1968).

- 6.- ALBANO, O., FRANCAVILLA, A.

La synthèse hépatique des β -lipoprotéines dans l'intoxication expérimentale par le tétrachlorure de carbone.

Path. et Biol., 16, 735-738, (1968).

- 7.- ALBERTS, A.W., MAJERUS, P.W., TALAMO, B., VAGELOS, P.R.

Acyl carrier protein. II. Intermediary reactions of fatty acid synthesis. Biochemistry, 3, 1563-1571, (1964).

8.- ALBERTS, A.W., VAGELOS, P.R.

Acetylcoenzyme A carboxylase. I. Requirement for two protein fractions.
Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)., 59, 561-568, (1968).

9.- ALTHAUSEN, T.L., THOENES, E.

Influence of carbohydrate metabolism of experimentally induced hepatic changes.II. Phosphorus poisoning.
Arch. intern. Med., 50, 58-75, (1932).

10.- ANDANT, J.P.E.

De l'empoisonnement par le phosphore et de son traitement par l'essence de térébenthine.
Ann. Hyg. publ., 40, 397-425, (1875).

11.- ANDERSON, C.E., LUCKEY, C.F., ROBINSON, C.S.

Increased urinary excretion of choline in the phosphorus poisoned dog.
Fed. Proc., 9, 145, (1950).

12.- ANTONIS, A.

Semiautomated method for the colorimetric determination of plasma free fatty acids.
J. Lipid Res., 6, 307-312, (1965).

13.- ARENA, J.M.

Phosphorus poisoning.
Clin. Pediat., 2, 132-133, (1963).

14.- ASHWORTH, C.T., STEMBRIDGE, V.A., SANDERS, E.

Lipid absorption, transport and hepatic assimilation studied with electron microscopy.
Amer. J. Physiol., 198, 1326-1328, (1960).

15.- ATKINSON, H.V.

Treatment of phosphorus poisoning.
J. Lab. clin. Med., 7, 148-150, (1921).

16.- Autoanalyzer methodology

Kjeldahl nitrogen (N-3b).

Technicon Corporation, Chauncey, N.Y., (1965).

17.- BAKER, N., SCHOTZ, M.C.

Use of multicompartmental models to measure rates of triglyceride metabolism in rats.

J. Lipid Res., 5, 188-197, (1964).

18.- BAKER, N., SCHOTZ, M.C.

Quantitative aspects of free fatty acid metabolism in the fasted rat.

J. Lipid Res., 8, 646-660, (1967).

19.- BALLARD, F.J., HANSON, R.W.

The citrate cleavage pathway and lipogenesis in rat adipose tissue : replenishment of oxaloacetate.

J. Lipid Res., 8, 73-79, (1967).

20.- BALLARD, F.J., HANSON, R.W., LEVEILLE, G.A.

Phosphoenolpyruvate carboxykinase and the synthesis of glyceride-glycerol from pyruvate in adipose tissue.

J. biol. Chem., 242, 2746-2750, (1967).

21.- BARAK, A.J.

Problem of the unit of reference in expressing biomedical data.

Clin. Chem., 16, 222-225, (1970).

22.- BARKER, E.A., SMUCKLER, E.A., BENDITT, E.P.

Effects of thioacetamide and yellow phosphorus poisoning on protein synthesis in vivo.

Lab. Invest., 12, 955-960, (1963).

23.- BARNES Jr, E.M., WAKIL, S.J.

Studies on the mechanism of fatty acid synthesis.XIX.Preparation and general properties of palmitylthioesterase.

J. biol. Chem., 243, 2955-2962, (1968).

24.- BAUER, J.

Über die Eiweisszersetzung bei Phosphorvergiftungen.
Z. Biol., 14, 527-541, (1878).

25.- BAYNE, J.R.D., BECK, J.C., LOWENSTEIN, L., BROWNE, J.S.L.

Cortisone acetate in the treatment of acute phosphorus poisoning.
Canad. med. Ass. J., 67, 465-467, (1952).

26.- BECK, W.S., OCHOA, S.

Metabolism of propionic acid in animal tissues. IV. Further studies
on the enzymatic isomerization of methylmalonyl coenzyme A.
J. biol. Chem., 232, 931-938, (1958).

27.- BELFRAGE, P.

Metabolism of chyle triglycerides in the liver. I. Studies on the
mechanisms for liver uptake of intravenously injected, glycerol and
fatty acids labelled chyle in the carbohydrate-fed rat.
Biochim. biophys. Acta., 125, 474-484, (1966).

28.- BERGMAYER, H.U.

Methods of enzymatic analysis.
New-York, Academic Press, (1965).

29.- BERGSTROM, S., BLOMSTRAND, R., BORGSTROM, B.

Route of absorption and distribution of oleic acid and triolein in
the rat.
Biochem. J., 58, 600-604, (1954).

30.- BERNARD, C.

Mémoire sur le pancréas et sur le rôle du suc pancréatique dans les
phénomènes digestifs, particulièrement dans la digestion des matières
grasses neutres.
Bailliére éd., Paris, (1856).

31.- BEST, C.H., MAC LEAN, D.L., RIDOUT, J.H.

Choline and liver fat in phosphorus poisoning.
J. Physiol. (Lond.), 83, 275-284, (1935).

32.- BHADURI, A., SRERE, P.A.

The incorporation of citrate carbon into fatty acids.
Biochem. biophys. Acta, (Amst.), 70, 221-230, (1963).

33.- BILANCIA, A.

Su di un caso di dermatite topica da fiammiferi.
Arch. ital. Derm., 34, 410-414, (1966).

34.- BJØRNSTAD, P., BREMER, J.

In vivo studies on pathways for the biosynthesis of lecithin in the rat.
J. Lipid Res., 7, 38-45, (1966).

35.- BJØRNTOP, P., FURMAN, R.H.

Lipolytic activity in rat epididymal fat pads.
Amer. J. Physiol., 203, 316-322, (1962).

36.- BLOMSTRAND, R.

The positional distribution of fatty acids in triglycerides and lecithins of human chylomicrons.
Acta Chem. scand., 19, 1778-1780, (1965).

37.- BLOMSTRAND, R., AHRENS Jr., E.H.

The absorption of fats studied in a patient with chyluria. II. Palmitic and oleic acids.
J. biol. Chem., 233, 321-326, (1958).

38.- BLONDEL, A., SOLLIER, R., DANG VAN CHUNG, NGUYEN VAN NHO.

Sur trente-neuf cas d'intoxication par le phosphore (suicide par ingestion de pétards chinois : Phào-Chà).
Presse méd., 61, 1322-1323, (1953).

39.- BLOOM, B., CHAIKOFF, I.L., REINHARDT, W.O.

Intestinal lymph as pathways for transport of absorbed fatty acids of different chain lengths.
Amer. J. Physiol., 166, 451-455, (1951).

- 40.- BLOOMFIELD, D.K., BLOCH, K.
The formation of Δ^9 -unsaturated fatty acids.
J. biol. Chem., 235, 337-345, (1960).
- 41.- BLUMENTHAL, S., LESSER, A.
Acute phosphorus poisoning.
Amer. J. Dis. Child., 55, 1280-1287, (1938).
- 42.- BOCIAN, J.
Zatrucie nieorganicznymi związkami fosforu i ich leczenie.
Pol. Tyg. lek., 23, 885-887, (1968).
- 43.- BODANSKY, M.
The effect of chloroform and phosphorus poisoning on carbohydrate tolerance.
J. biol. Chem., 58, 515-522, (1923).
- 44.- BORGSTROM, B.
Transport form of ^{14}C - decanoic acid in portal and inferior vena cava blood during absorption in the rat.
Acta physiol. scand., 34, 71-74, (1955).
- 45.- BORGSTROM, B.
Studies of the phospholipids of human bile and small intestinal content.
Acta chem. scand., 11, 749, (1957).
- 46.- BORGSTROM, B., DAHLQVIST, A., LUNDH, G., SJOVALL, J.
Studies on intestinal digestion and absorption in the human.
J. clin. Invest., 36, 1521-1536, (1957).
- 47.- BORGSTROM, B., LUNDH, G., HOFMANN, A.
The site of absorption of conjugated bile salts in man.
Gastroenterology, 45, 229-238, (1963).
- 48.- BORGSTROM, B., OLIVECRONA, T.
The metabolism of palmitic acid- ^{14}C in functionally hepatectomized rats.
J. lipid Res., 2, 263-267, (1961).

49.- BORTZ, W.M., LYNEN, F.

The inhibition of acetyl CoA carboxylase by long chain acyl CoA derivatives.

Biochem. Z., 337, 505-509, (1963).

50.- BOUCROT, C., CLEMENT, J.

Localisation des acides gras d'origine exogène et endogène dans les molécules de triglycerides des chylomicrons lymphatiques du rat après administration d'un régime contenant simultanément des acides oléïques ^3H et stéarique ^{14}C .

Biochim. biophys., Acta, (Amst.) 106, 414-416, (1965).

51.- BRADY, R.O., BRADLEY, R.M., TRAMS, E.G.

Biosynthesis of fatty acids. I. Studies with enzymes obtained from liver.

J. biol. Chem., 235, 3093-3098, (1960).

52.- BRADY, R.O., GURIN, S.

Biosynthesis of fatty acids by cell-free or water-soluble enzyme systems.

J. biol. Chem., 199, 421-431, (1952).

53.- BRADY, R.O., MAMOON, A.M., STADTMAN, E.R.

The effects of citrate and coenzyme A on fatty acid metabolism.

J. biol. Chem., 222, 795-802, (1956).

54.- BRAGDON, J.H.

On the composition of chyle chylomicrons.

J. Lab. clin. Med., 52, 564-570, (1958).

55.- BREMER, J.

Carnitine in intermediary metabolism. Reversible acylation of carnitine by mitochondria.

J. biol. Chem., 237, 2228-2231, (1962).

- 56.- BREMER, J., FIGARD, P.H., GREENBERG, D.M.

The biosynthesis of choline and its relation to phospholipid metabolism.

Biochim. biophys. Acta, (Amst.), 43, 477-488, (1960).

- 57.- BREMER, J., GREENBERG, D.M.

Methyl transferring enzyme system of microsomes in the biosynthesis of lecithin (phosphatidylcholine).

Biochim. biophys. Acta, (Amst.), 46, 205-216, (1960).

- 58.- BRESCIA, M.A., DOBBINS, J.M.

Acute phosphorus poisoning. Report of a case with recovery
J. Pediat., 21, 378-381, (1942).

- 59.- BRESSLER, R., FRIEDBERG, S.J.

The effect of carnitine on the rate of palmitate incorporation into mitochondrial phospholipids.

J. biol. Chem., 239, 1364-1368, (1964).

- 60.- BRESSLER, R., WAKIL, S.J.

Synthesis of long chain fatty acids.

Fed. Proc., 20, Part I, 274, (1961).

- 61.- BREWER, E., HAGGERTY, R.J.

Toxic hazards. Rat poisons. II. Phosphorus.

New Engl. J. med., 258, 147-148, (1958).

- 62.- BRIGGS, A.P.

Some applications of the colorimetric phosphate method.

J. biol. Chem., 59, 255-264, (1924).

- 63.- BRILIANT, J.

Phosphor und Phosphorwasserstoff.

Arch. exp. Path. Pharmac., 15, 439-449, (1882).

64.- BRINDLEY, D.N., HUBSCHER, G.

The intracellular distribution of the enzymes catalysing the biosynthesis of glycerides in the intestinal mucosa.

Biochim. biophys. Acta, (Amst.), 106, 495-509, (1965).

65.- BRINDLEY, D.N., HUBSCHER, G.

The effect of chain length on the activation and subsequent incorporation of fatty acids into glycerides by the small intestinal mucosa.

Biochim. biophys. Acta, (Amst.), 125, 92-105, (1966).

66.- BROUARDEL, P.

Les intoxications.

J.B. Baillière & fils éd., Paris, (1904).

67.- BROUARDEL, P., VIBERT, C.

Inculcation d'intoxication par l'huile de foie de morue phosphorée.

Affaire du Dr. Massart (de Honfleur). (Acquittement en 1ère instance condamnation en appel).

Ann. Hyg. publ., 42, 113-142, (1899).

68.- BROWN, C.A., HALPERT, B.

Poisoning with yellow phosphorus.

Sth. med. J., (Bgham, Ala.), 50, 740-742, (1957).

69.- BUBLITZ, C., KENNEDY, E.P.

Synthesis of phosphatides in isolated mitochondria. III. The enzymatic phosphorylation of glycerol.

J. biol. Chem., 211, 951-961, (1954).

70.- BUCHANAN, D.J., SIGAL, M.V., ROBINSON, C.S., POPE, K., FERGUSON, M.E., THOMISON, J.B.

Studies of phosphorus intoxication. I. Changes in blood, urine, and tissues of dogs poisoned with Phosphorus.

Arch. industr. Hyg., 9, 1-8, (1954).

71.- BURSTEIN, M.

Isolement des lipoprotéines sériques de faible densité après floculation par le phosphotungstate de soude à pH neutre en présence de chlorure de magnésium.

Nouv. Rev. franc. Hémat., 3, 139-148, (1963).

72.- BURSTEIN, M., SAMAILLE, J.

Nouvelle méthode de séparation et de dosage des lipoprotéines de faible densité.

Ann. Biol. clin., 17, 23-34, (1959).

73.- BUTCHER, R.W., SUTHERLAND, E.W.

Adenosine 3',5'-phosphate in biological materials. I. Purification and properties of cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase and use of this enzyme to characterize adenosine 3',5'-phosphate in human urine.

J. biol. Chem., 237, 1244-1250, (1962).

74.- BYGRAVE, F.L.

Studies on the biosynthesis and turnover of the phospholipid components of the inner and outer membranes of rat liver mitochondria.

J. biol. Chem., 244, 4768-4772, (1969).

75.- CALEY, J.P., KELLOCK, I.A.

Acute yellow phosphorus poisoning with recovery.

Lancet, 1, 539-541, (1955).

76.- CALIFANO, L.

Il ricambio del tessuto e la ossidazione del grasso nella degenerazione grassa.

Sperimentale, 88, 325-335, (1934).

77.- CALIFANO, L.

Über Fettsäureoxydation bei der Fettleber.

Biochem. Z., 289, 354-364, (1937).

78.- CAMERON, J.M., PATRICK, R.S.

Experimental acute phosphorus poisoning.

Proc. Third. Internat. Conf. for Med., p. 133, (1963).

79.- CAMERON, J.M., PATRICK, R.S.

Acute phosphorus poisoning. The distribution of toxic doses of yellow phosphorus in the tissues of experimental animals.

Med. Sci. Law., 6, 209-214, (1966).

80.- CAMERON, J.M., RENTOUL, E.

Acute phosphorus poisoning.

Med. Sci. Law, 3, 71-76, (1963).

81.- CAREY, E.M., DILS, R., HANSEN, J.M.

Chain-length specificity for termination of fatty acid biosynthesis by fatty acid synthetase complexes from lactating rabbit mammary gland and rat liver.

Biochem. J., 117, 633-635, (1970).

82.- CARLSON, L.A., ORÖ, L.

Studies on the relationship between the concentration of plasma free fatty acids and glycerol in vivo.

Metabolism, 12, 132-142, (1963).

83.- CAROFF, J., BRETON, J., HADENGUE, A., DEROBERT, L.

Aspects histologiques du foie dans l'intoxication par le phosphore.

Méd. lég., 1, 178-179, (1968).

84.- CATOLLA-CAVALCANTI, A.

Sulla steatosi epatica da fosforo.

Azione lipotropa della colina e dell'associazione colina-inositolo.

Minerva med., 41, 927-931, (1950).

85.- CATOLLA-CAVALCANTI, A., LEVIS, F.

Sulla steatosi epatica da fosforo,

I. Azione lipotropa dell'acido pantotenico e della sua associazione con la mesoinosite.

Arch. Sci. med., 90, 529-541, (1950).

86.- CAUMONT, L.

A propos d'un cas d'intoxication phosphorée.

Thèse doct. Médecine, Paris, (1950).

87.- CAUSSE, S.

Empoisonnement par les allumettes chimiques (Rapport de CHEVALLIER, A).

Bull. Acad. Méd., 19, 1072-1084, (1853-1854).

88.- CHABROL, E., CHARONNAT, R.

Une nouvelle réaction pour l'étude des lipides : l'oléidémie.

Presse méd., 52, 1713-1714, (1937).

89.- CHERKES, A., GORDON, Jr., R.S.

The liberation of lipoprotein lipase by heparin from adipose tissue incubated in vitro.

J. Lipid Res., 1, 97-101, (1959).

90.- CHEVALLIER, A.

Mémoire sur les allumettes chimiques préparées avec le phosphore ordinaire et sur les dangers qu'elles présentent sous le rapport de la santé des ouvriers, de l'empoisonnement et de l'incendie.

Ann. Hyg. publ., 15, 254-337, (1861).

91.- CHRETIEN, T.E.

Acute phosphorus poisoning. Report of a case with recovery.

New Engl. J. Med., 232, 247-249, (1945).

92.- CHRIST, E.J.V.J.

Fatty acid synthesis in mitochondria. Elongation of short-chain fatty acids and formation of unsaturated long-chain fatty acids.

Biochim. biophys. Acta, (Amst.), 152, 50-62, (1968).

93.- CHRISTIE, G.S., JUDAH, J.D.

Intracellular distribution of enzymes.

Proc. roy. Soc. Edimb. B., 141, 420-433, (1953).

94.- CLARA, M.

Ueber den Bau der Leber beim Kaninchen und die Regenerationserscheinungen an diesem Gewebe bei experimenteller Phosphorvergiftung.

Z. mikr-anat. Forsch., 26, 45-172, (1931).

95.- CLARK, B., HUBSCHER, G.

Biosynthesis of glycerides in the mucosa of the small intestine.

Nature (Lond.), 185, 35-37, (1960).

96.- CLARK, B., HUBSCHER, G.

Biosynthesis of glycerides in subcellular fractions of intestinal mucosa.

Biochim. biophys. Acta, (Amst.), 46, 479-494, (1961).

97.- CLAUDE, J.R., CORRE, F.

Considérations pratiques sur le dosage semi-automatique des triglycérides sériques par fluorométrie (méthode de Kessler et Lederer).

Comparaison avec la méthode manuelle colorimétrique de Van Handel et Zilversmit.

Ann. Biol. clin., 26, 451-464, (1968).

98.- CLEMENT, G.

La digestion et l'absorption des graisses.

J. Physiol., (Paris), 56, 111-192, (1964).

99.- CLEMENT, J., CLEMENT, G.

Les données récentes de la stéatose hépatique.

Cah. Nutr. Diét., II, 41-47, (1967).

100.- COLLI, W., HINKLE, P.C., PULLMAN, M.E.

Characterization of the fatty acid elongation system in soluble extracts and membrane preparations of rat liver mitochondria.

J. biol. Chem., 244, 6432-6443, (1969).

101.- COMBRET, Y., LAUDAT, P.

Données récentes sur les phénomènes de lipolyse au niveau du tissu adipeux

Rev. franc. Etud. clin. biol., 13, 329-340, (1968).

102.- CONSTANTIN, M.J., SAVARY, P.

Sur l'incorporation des chaînes stéariques dans les chylomicrons lymphatiques du rat.

Biochim. biophys. Acta, (Amst.), 106, 248-260, (1965).

103.- COQUET, B.

Hépatites expérimentales et tests de triage des médicaments hépatoprotecteurs.

Thèse doct. Pharmacie, Lyon, (1965).

104.- CORWIN, A.E.

Report of a case of phosphorus poisoning from sucking a "Spit-Devil".

N.Y. St. J. Med., 22, 475-476, (1922).

105.- COULOMB, J.

Essai sur le phosphore.

Thèse Pharmacie 1ère Classe, Paris, (1869).

106.- CRANE, C.W., EBELING, P., BENTLEY, A.B.

A fatal case of acute phosphorus poisoning.

Aust. Ann. Med., 8, 66-70, (1959).

107.- CUSHMAN Jr, P., ALEXANDER, B.H.

Renal phosphate and calcium excretory defects in a case of acute phosphorus poisoning.

Nephron, 3, 123-128, (1966).

108.- CUTLER, J.T.

The accumulation of guanidine in the blood following acute liver injury by carbon tetrachloride, chloroform, arsenic or phosphorus.

J. Pharmacol. exp. Ther., 41, 337-345, (1931).

109.- DAAE, L.N.W., BREMER, J.

The acylation of glycerol phosphate in rat liver. A new assay procedure for glycerol phosphate acylation, studies on its subcellular and submitochondrial localization and determination of the reaction products.

Biochim. biophys. Acta, (Amst.), 210, 92-104, (1970).

110.- DAGRAS, G., MAGNIN, P.

Formation de lots d'animaux aux fins d'expérimentations comportementales.
Communication au 88ème Congrès de l'Association Française pour l'Avancement des Sciences, Séance du 4.7.69 (Besançon 3.8.7.69).

111.- DAIKUHARA, Y., TSUNEMI, T., TAKEDA, Y.

The role of ATP-citrate lyase in the transfer of acetyl groups in rat liver.

Biochim. biophys. Acta, (Amst.), 158, 51-61, (1968).

112.- DANIEL, E.

L'intoxication par le phosphore.

Thèse doct. Médecine, Paris (1936).

113.- DAS, M.L., ORRENIUS, S., ERNSTER, L.

On the fatty acid and hydrocarbon hydroxylation in rat liver microsomes.
Europ. J. Biochem., 4, 519-523, (1968).

114.- DATHE, R.A., NATHAN, D.A.

Electrocardiographic changes resulting from phosphorus poisoning.
Amer. Heart J., 31, 98-102, (1946).

115.- DAVID, J.S.K., MALATHI, P., GANGULY, J.

Role of the intestinal brush border in the absorption of cholesterol in rats.

Biochem. J., 98, 662-668, (1966).

116.- DEL MONTE, U., FONNESU, A.

Incorporazione in vivo del fosfato radioattivo nei fosfolipidi del fegato grasso da tossici chimici.

G. Biochim., 8, 244-254, (1959).

117.- DELBRUCK, A., ZEBE, E., BUCHER, T.

Über Verteilungsmuster von Enzymen des Energie liefernden Stoffwechsels im Flugmuskel, Sprungmuskel und Fettkörper von Locusta migratoria und ihre cytologische Zuordnung.

Biochem. Z., 331, 273-296, (1959).

118.- DELKERS, H.A.

Ueber die Entgiftung des Phosphors durch "Vitamin F".
Münch. med. Wschr., 88, 680-681, (1941).

119.- DEROBERT, L., HADENGUE, A., MARTIN, R., LE BRETON, R., FOURNIER, E.

Etude anatomique et histologique de trois cas d'intoxication phosphorée aigüe.
Ann. Méd. lég., 32, 316-321, (1952).

120.- DEROBERT, L., LE BRETON, R., MARTIN, R.

Nouveau cas d'intoxication mortelle par le phosphore. Considérations anatomo-pathologiques.
Ann. Méd. lég., 31, 284-285, (1951).

121.- DERVIEUX, F., DUVOIR, M., MELISSINOS, J., BERNARD, J.

Empoisonnement-suicide par une "mort-aux-rats" phosphorée.
Ann. Méd. lég., 14, 615-621, (1934).

122.- DESQUEYROUX, J.

Recherches expérimentales sur les troubles des échanges azotés dans l'intoxication phosphorée aigüe.
Rev. Méd., (Paris), 39, 616-637, (1922).

123.- DI LUZIO, N.R.

Influences of intravenously administrated hexahydrocoenzyme Q₄ on liver injury.
Life Sci., 5, 1467-1478, (1966).

124.- DI NELLA, R.R., MENG, H.C., PARK, C.R.

Properties of intestinal lipase.
J. biol. Chem., 235, 3076-3081, (1960).

125.- DIANZANI, M.U.

Uncoupling of oxidative phosphorylation in mitochondria from fatty liver.
Biochim. biophys. Acta, (Amst.), 14, 514-532, (1954).

126.- DIANZANI, M.U.

Content and distribution of pyridine nucleotides in fatty liver.
Biochim. biophys. Acta, (Amst.), 17, 391-405, (1955).

127.- DIANZANI, M.U.

The content of adenosine polyphosphates in fatty livers.
Biochem. J., 65, 116-124, (1957).

128.- DIANZANI, M.U., BAHR, G.F.

Electron microscope investigation of mitochondria isolated from normal and steatotic livers by differential centrifugation.
Acta path. microbiol. scand., 35, 25-38, (1954).

129.- DIANZANI, M.U., MARINARI, U.

The octanoate oxidation by mitochondria from fatty liver.
Biochim. biophys. Acta, (Amst.), 48, 552-561, (1961).

130.- DIANZANI, M.U., VITI, I.

The content and distribution of cytochrome c in the fatty liver of rats.
Biochem. J., 59, 141-145, (1955).

131.- DIAZ-RIVERA, R.S., COLLAZO, P.J., PONS, E.R., TORREGROSA, M.V.

Acute phosphorus poisoning in man : a study of 56 cases.
Medicine (Baltimore), 29, 269-298, (1950).

132.- DIAZ-RIVERA, R.S., RAMOS-MORALES, F., GARCIA-PALMIERI, M.R., RAMIREZ, A.E.A.

The electrocardiographic changes in acute phosphorus poisoning in man.
Amer. J. med. Sci., 241, 758-765, (1961).

133.- DORSEY, J.A., PORTER, J.W.

The effect of palmityl coenzyme A on pigeon liver fatty acid synthetase.
J. biol. Chem., 243, 3512-3516, (1968).

134.- DRILL, V.A.

Hepatotoxic agents. Mechanism of action and dietary interrelationship.
Pharmacol. Rev., 4, 1-42, (1952).

135.- DUCCESCHI, V., ALMAGIA, M.

Sur les processus fermentatifs du foie.
Arch. ital. Biol., 39, 29-39, (1903).

136.- DWYER, H.L., HELWIG, F.C.

Phosphorus poisoning in a child, from the ingestion of fireworks.
J. Amer. med. Ass., 84, 1254-1256, (1925).

137.- EATON, R.P., STEINBERG, D., BERMAN, M.

Quantitative evaluation of free fatty acid and glyceride fatty acid metabolism in man.
J. clin. Invest., 44, 1042, (1965).

138.- Empoisonnement à la suite d'une médication phosphorée. Acquittement du médecin.

Ann. Hyg. publ., 26, 517-519, (1891).

139.- ENNOR, A.H.

Oxygen consumption and ketone body production in the carbon tetrachloride and phosphorus fatty livers.
Aust. J. exp. Biol. med. Sci., 20, 73-80, (1942).

140.- ETIENNE, G., PAPIN, J.P., RENAULT, H.

Une méthode simple de dosage du cholestérol total par voie automatique.
Ann. Biol. clin., 21, 851-859, (1963).

141.- FABRE, E.

De la dégénérescence graisseuse dans l'empoisonnement aigu par le phosphore.
Thèse doct. Médecine, Paris, (1864).

142.- FALCK, F.A.

Der inanitielle Stoffwechsel und seine Bedeutung für Pharmakologie und Toxikologie.
Exper. Arch., 7, 570, (1877).

143.- FARBER, E., Mc CONOMY, J.M.

Selective effect of adenine in preventing fatty liver.

Lab. Invest., 15, 1490-1491, (1966).

144.- FELDMAN, E.B., BORGSTROM, B.

Absorption of di and triglycerides by intestinal slices in vitro.

Lipids. 1, 128-131, (1966).

145.- FELTS, J.M., MASORO, E.J.

Effects of cold acclimation on hepatic carbohydrate and lipid metabolism.

Amer. J. Physiol., 197, 34-36, (1959).

146.- FISCHLER, F.

Die Entgiftung tödlicher Phosphorgaben durch Stoffwechselbeeinflussung der Leber.

Münch. med. Wschr., 88, 62-66, (1941).

147.- FISCHLER, F., BARDACH, K.

Über Phosphorvergiftung am Hunde mit partieller Leberausschaltung (Eckscher Fistel).

Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem., 78, 435-463, (1912).

148.- FISCHLER, F., SCHULTE, K.E.

Ueber die Entgiftung tödlicher Phosphorgaben durch Stoffwechselbeeinflussung der Leber.

Münch. med. Wschr., 88, 854-857, (1941).

149.- FLAVIN, M., OCHOA, S.

Metabolism of propionic acid in animal tissues. I. Enzymatic conversion of propionate to succinate.

J. biol. Chem., 229, 965-979, (1957).

150.- FLEMING, R.B.L., MILLER, J.W., SWAYNE Jr., V.R.

Some recent observations on phosphorus toxicology.

J. industr. Hyg., 24, 154-158, (1942).

- 151.- FLETCHER, G.F., GALAMBOS, J.T.

Phosphorus poisoning in humans.

Arch. intern. Med., 112, 846-852, (1963).

- 152.- FOLCH, J., LEES, M., SLOANE-STANLEY, G.H.

A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues.

J. biol. Chem., 226, 497-509, (1957).

- 153.- FORT, J.

Des combinaisons chimiques du phosphore et de l'essence de térébenthine : déductions physiologiques et cliniques.

Thèse doct. Médecine, Paris (1881).

- 154.- FOSTER, D.W., SRERE, P.A.

Citrate cleavage enzyme and fatty acid synthesis.

J. biol. Chem., 243, 1926-1930, (1968).

- 155.- FRANCO-QUEVEDO, G.

Intoxicación por fosforo blanco.

Rev. Soc. colomb. Pediat., 5, 251-268, (1963).

- 156.- FRANK, E., ISAAC, C.

Über das Wesen des gestörten Stoffwechsels bei der Phosphorvergiftung.

Arch. exp. Path. Pharmac., 64, 274-292, (1911).

- 157.- FRAZER, A.C.

Differentiation in the absorption of olive oil and oleic acid in the rat.

J. Physiol., (Lond.), 103, 306-312, (1944).

- 158.- FRAZER, A.C.

Surface phenomena in chemistry and biology.

Pergamon Press, London, New York, (1958).

- 159.- FREDRICKSON, D.S., GORDON, R.S Jr.
Transport of fatty acids.
Physiol. Rev., 38, 585-630, (1958).
- 160.- FREEMAN, C.P., WEST, D.
Complete separation of lipid classes on a single thin-layer plate.
J. Lipid Res., 7, 324-327, (1966).
- 161.- FREJAVILLE, J.P.
Intoxication par le phosphore.
Concours méd., 89, 6323-6327, (1967).
- 162.- FRIEDBERG, S.J., KLEIN, R.F., TROUT, D.L., BOGDONOFF, M.D., ESTES Jr, E.H.
The incorporation of plasma free fatty acids into plasma triglycerides in man.
J. clin. Invest., 40, 1846-1855, (1961).
- 163.- FRITZ, E., RANVIER, L., VERLIAC, J.
De la stéatose dans l'empoisonnement par le phosphore.
Arch. gén. Méd., 2, 6ème sér., 25-47, (1863).
- 164.- FRITZ, I.B.
Action of carnitine on long chain fatty acid oxidation by liver.
Amer. J. Physiol., 197, 297-304, (1959).
- 165.- FRITZ, I.B., YUE, K.T.N.
Long-chain carnitine acyltransferase and the role of acylcarnitine derivatives in the catalytic increase of fatty acid oxidation induced by carnitine.
J. Lipid Res., 4, 279-288, (1963).
- 166.- FROMMEL, E., PIQUET, J., CUENOT, C.L.
L'intoxication par le phosphore étudié dans le cadre de "l'hypovitaminose C cellulaire".
Helv. physiol. pharmacol. Acta., 4, 309-310, (1946).

167.- FRYE, F.L., CUCUEL, J.P.E.

Acute yellow phosphorus poisoning in a cat.

Vet. Med., 64, 995-996, (1969).

168.- GALZIGNA, L., ROSSI, C.R., SARTORELLI, L., GIBSON, D.M.

A guanosine triphosphate-dependent acylcoenzyme A synthetase from rat liver mitochondria.

J. biol. Chem., 242, 2111-2115, (1967).

169.- GANOTE, C.E., OTIS, J.B.

Characteristic lesions of yellow phosphorus-induced liver damage.

Lab. Invest., 21, 207-213, (1969).

170.- GAULTIER, M., FOURNIER, F., GERVAIS, P., FREJAVILLE, J.P., PRIEUR, F.

Cinq cas d'intoxication par l'amanite phalloïde.

Bull. Soc. méd. Hôp. Paris, 113, 967-978, (1962).

171.- GELLHORN, A., BENJAMIN, W.

Lipid biosynthesis in adipose tissue during aging and in diabetes.

Ann. N.Y. Acad. Sci., 131, 344-356, (1965).

172.- GELLHORN, A., BENJAMIN, W.

The effect of insulin on monounsaturated fatty acid synthesis in diabetic rats. The stability of the informational RNA and of the enzyme system concerned with fatty acid desaturation.

Biochim. biophys. Acta (Amst.), 116, 460-466, (1966).

173.- GHIRON, M.

Sull'azione epatoprotettiva di enzimi epatici nell'intossicazione fosforica. I. Ricerche anatomiche.

Ric. scient., 25, 62-75, (1955).

174.- GHIRON, M.

Sull'azione epatoprotettiva di enzimi epatici nell'intossicazione fosforica. II. Ricerche funzionali.

Ric. scient., 25, 284-295, (1955).

175.- GHIRON, M.

Sull'azione epatoprotettiva di enzimi epatici nell'intossicazione fosforica. III. Attività colinossidasica del fegato.

Ric. scient., 26, 1437-1441, (1956).

176.- GHOSHAL, A.K., PORTA, E.A., HARTROFT, W.S.

The role of lipoperoxidation in the pathogenesis of fatty livers induced by phosphorus poisoning in rats.

Amer. J. Path., 54, 275-291, (1969).

177.- GIBSON, D.M., TITCHENER, E.B., WAKIL, S.J.

Requirement for bicarbonate in fatty acid synthesis.

J. Amer. chem. Soc., 80, 2908, (1958).

178.- GIBSON, K.D., WILSON, J.D., UDENFRIEND, S.U.

The enzymic conversion of phospholipid ethanolamine to phospholipid choline in rat liver.

J. biol. Chem., 236, 673-679, (1961).

179.- GLOMSET, J.A.

The plasma lecithin : cholesterol acyltransferase reaction.

J. Lipid Res., 9, 155-167, (1968).

180.- GOLDFINE, H.

Acylation of glycerol-3-phosphate in bacterial extracts. Stimulation by acyl carrier protein.

J. biol. Chem., 241, 3864-3866, (1966).

181.- GOLDFINE, H., AILHAUD, G.P., VAGELOS, P.R.

Involvement of ACP in acylation of glycerol-3-phosphate in *Clostridium butyricum*. II Evidence for the participation of acyl thioesters of ACP.

J. biol. Chem., 242, 4466-4475, (1967).

182.- GOLDMAN, P.

Acyl-bound intermediates in fatty acid synthesis.
J. biol. Chem., 239, 3663-3667, (1964).

183.- GOLDMAN, P., ALBERTS, A.W., VAGELOS, P.R.

The condensation reaction of fatty acid biosynthesis. II. Requirement of the enzymes of the condensation reaction for fatty acid synthesis.
J. biol. Chem., 238, 1255-1261, (1963).

184.- GOLDMAN, P., ALBERTS, A.W., VAGELOS, P.R.

The condensation reaction of fatty acid synthesis. III Identification of the protein-bound product of the reaction and its conversion to long chain fatty acids.
J. biol. Chem., 238, 3579-3583, (1963).

185.- GOLDMAN, P., VAGELOS, P.R.

The formation of enzyme-bound acetoacetate and its conversion to long chain fatty acids.
Biochem. biophys. Res. Commun., 7, 414-418, (1962).

186.- GOODMAN, D.S.

The interaction of human serum albumin with long chain fatty acid anions.
J. Amer. chem. Soc., 80, 3892-3898, (1958).

187.- GORDON, R.S., BOYLE, E., BROWN, R.K., CHERKES, A., ANFINSEN, C.B.

Role of serum albumin in lipemia clearing reaction.
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.), 84, 168-170, (1953).

188.- GORNALL, A.G., BARDAWILL, C.J., DAVID, M.M.

Determination of serum proteins by means of the biuret reaction.
J. biol. Chem., 177, 751-766, (1949).

189.- GREENBERGER, N.J., ROBINSON, W.L., ISSELBACHER, K.J.

Toxic hepatitis after the ingestion of phosphorus with subsequent recovery.
Gastroenterology, 47, 179-183, (1964).

- 190.- GREENBERGER, N.J., RODGERS, J.B., ISSELBACHER, K.J.
Absorption of medium and long chain triglycerides ; factors influencing their hydrolysis and transport.
J. clin. Invest., 45, 217-227, (1966).
- 191.- GRIGAUT, A.
Procédé colométrique de dosage de la cholestérine dans l'organisme.
C.R. Soc. Biol. (Paris), 68, 791-793, (1910).
- 192.- GROS, R.
Recherche très sensible du phosphore. Modification du procédé de Mitscherlich.
J. Pharm. Chim. (Paris), 22, 211-215, (1935).
- 193.- GUCHHAIT, R.B., PUTZ, G.R., PORTER, J.W.
Synthesis of long-chain fatty acids by microsomes of pigeon liver.
Arch. Biochem., 117, 541-549, (1966).
- 194.- GUDER, W., WEISS, L., WIELAND, O.
Triglyceride breakdown in rat liver. The demonstration of three different lipases.
Biochim. biophys. Acta (Amst.), 187, 173-185, (1969).
- 195.- GUEYE, S.N'D., GOUDOTE, E., OBONOU, D.
A propos d'une intoxication au phosphore.
Bull. Soc. méd. Afr. noire Langue franç., 11, 81-82, (1966).
- 196.- GUY, E.P.
Contribution à l'étude de l'intoxication phosphorée.
Thèse doct. Médecine, Paris, (1939).
- 197.- HAESSLER, H.A., ISSELBACHER, K.J.
Glycerol metabolism in the intestinal mucosa and its role in fat absorption.
Amer. J. Dis. Child., 104, 543, (1962).

- 198.- HAFT, D.E., ROHEIM, P.S., WHITE, A., EDER, H.A.
Plasma lipoprotein metabolism in perfused rat livers. I Protein
synthesis and entry into the plasma.
J. clin. Invest., 41, 842-849, (1962).
- 199.- HALL, R.
Matches.
Nat. Clearinghouse Poison Contr. Cent. Bull., 1-2, (Nov, Déc 1968).
- 200.- HAMMER, H.
Ein Fall von Phosphorvergiftung mit selten rasch letalem Ausgange.
Präg. med. Wschr., 14, 79-81, (1889).
- 201.- HANN, R.G., VEALE, R.A.
A fatal case of poisoning by phosphorus with unusual subcutaneous
hemorrhages.
Lancet, 88, 163-164, (1910).
- 202.- HASHIM, S.A., KRELL, K., MAO, P., VAN ITALLIE.
Portal venous transport of free pelargonic acid following intestinal
instillation of tripelargonin.
Nature (Lond.), 527-528, (1965).
- 203.- HATCH, F.T., ASO, Y., HAGOPIAN, L.M., RUBENSTEIN, J.J.
Biosynthesis of lipoprotein by rat intestinal mucosa.
J. biol. Chem., 241, 1655-1665, (1966).
- 204.- HAVEL, R.J.
Conversion of plasma free fatty acids into triglycerides of plasma
lipoprotein fraction in man.
Metabolism., 10, 1031-1036, (1961).
- 205.- HAVEL, R.J., FELTS, J.M., VAN DUYNE, C.M.
Formation and fate of endogenous triglycerides in blood plasma of
rabbits.
J. Lipid Res., 3, 297-308, (1962).

206.- HEIMANN, H.

Chronic phosphorus poisoning.

J. industr. Hyg., 28, 142-150, (1946).

207.- HENRY, O., CHEVALLIER, A.

Etudes chimiques et médico-légales sur le phosphore.

Ann. Hyg. publ., 7, 414-435, 2è série, (1857).

208.- HENRY, O., CHEVALLIER, A.

Etudes chimiques et médico-légales sur le phosphore.

Ann. Hyg. publ., 8, 208-226, 2è série, (1857).

209.- HIMSWORTH, H.P., GLYNN, L.E.

Toxipathic and trophopathic hepatitis.

Lancet, 246, 457-461, (1944).

210.- HOFMANN, A.F., BORGSTRÖM, B.

Hydrolysis of long-chain monoglycerides in micellar solution by pancreatic lipase.

Biochim. biophys. Acta, (Amst.) 70, 317-331, (1963).

211.- HOLCZABEK, W.

Ein experimenteller Beitrag zur Phosphorvergiftung.

Klin. Med. (Wien), 8, 256-261, (1953).

212.- HOLLOWAY, P.W., WAKIL, S.J.

Requirement for reduced diphosphopyridine nucleotide-cytochrome b_5 reductase in stearyl coenzyme A desaturation.

J. biol. Chem., 245, 1862-1865, (1970).

213.- HOLT, P.R., HAESSLER, H.A., ISSELBACHER, K.J.

Effects of bile salts on glucose metabolism by slices of hamster small intestine.

J. clin. Invest., 42, 777-786, (1963).

214.- HOWARD Jr., C.F.

Synthesis of fatty acids in outer and inner membranes of mitochondria.
J. biol. Chem., 245, 462-468, (1970).

215.- HSU, R.Y., WASSON, J., PORTER, J.W.

The purification and properties of the fatty acid synthetase of pigeon liver.
J. biol. Chem., 240, 3736-3746, (1965).

216.- HUMPHREYS, E.M., HALPERT, B.

Acute phosphorus poisoning. Report of a case due to ingestion of fireworks.
Amer. J. Dis. Child., 41, 354-359, (1931).

217.- HURKA, W.

Tierexperimentelle Untersuchungen mit weissem Phosphor und seinen Oxydationsprodukten.
Klin. Med. (Wien), 2, 1014-1024, (1947).

218.- INFANTE, R.

Métabolisme des glycérides et des phospholipides.
Journée d'étude sur le métabolisme des lipides, Marseille, 3 Avril 1969.

219.- ISHIHARA, H.

Über die Stickstoffverteilung im Hundeharne bei subchronischer Phosphorvergiftung (Ein Beitrag zur funktionellen Diagnostik der Lebertrankeheiten).
Biochem. Z., 41, 315-324, (1912).

220.- ISSELBACHER, K.J.

Biochemical aspects of lipid malabsorption.
Fed. Proc., 26, 1420-1425, (1967).

221.- IVE, F.A.

Studies in contact dermatitis. XXI Matches.
Trans. St John's Hosp. derm. Soc. (Lond.), 53, 135-140, (1967).

222.- IZAR, G.

Avvelenamento acuto da fosforo. Lezione clinica.
Gazz. san., 11, 417-422, (1950).

223.- JACOBY, M.

Über die Beziehungen der Leber und Blutveränderungen bei Phosphorver-
giftung zur Autolyse.
Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem., 30, 174-181, (1900).

224.- JACOBZINER, H., RAYBIN, H.W.

Phosphorus, phenothiazine, and arsenic poisonings.
N.Y. St. J. Med., 61, 620-622, (1961).

225.- JACOBZINER, H., RAYBIN, H.W.

Triflupromazine hydrochloride, aspirin, and phosphorus poisonings.
N.Y. St. J. Med., 62, 2847-2849, (1962).

226.- JASTROWITZ, H.

Versuche über Glykokolabbau bei Leberschidigungen.
Arch. exp. Path. Pharmac., 59, 463-472, (1908).

227.- JEZEQUEL, A.M.

Les effets de l'intoxication aigüe au phosphore sur le foie de rat.
Etude au microscope électronique.
Ann. Anat. path., 3, 512-537, (1958).

228.- JOBLING, J.W., EGGSTEIN, A.A., PETERSEN, W.

The relation of serum esterase to liver destruction. Studies on ferment
action.
J. exp. Med., 22, 707-712, (1915).

229.- JOHNSTON, C.G., IRVIN, J.L., WALTON, C.

The free choline and phospholipid of hepatic and gallbladder bile.
J. biol. Chem., 131, 425-437, (1939).

- 230.- JONES, P.D., HOLLOWAY, P.W., PELUFFO, R.O., WAKIL, S.J.
A requirement for lipids by the microsomal stearyl coenzymeA desaturase.
J. biol. Chem., 244, 744-754, (1969).
- 231.- JOSHI, V.C., PLATE, C.A., WAKIL, S.J.
Studies on the mechanism of fatty acid synthesis. XXIII The acyl binding sites of the pigeon liver fatty acid synthetase.
J. biol. Chem., 245, 2857-2867, (1970).
- 232.- KENNEDY, E.P.
Metabolism of lipids.
Ann. Rev. Biochem., 26, 119-142, (1957).
- 233.- KENNEDY, E.P., WEISS, S.B.
The function of cytidine coenzymes in the biosynthesis of phospholipids.
J. biol. Chem., 222, 193-214, (1956).
- 234.- KESSLER, G., LEDERER, H.
Fluorometric measurement of triglycerides.
Communication au symposium Technicon "Automation in Analytical Chemistry"
New-York, 8 Septembre 1965.
- 235.- KIANG, P.C.
Studies in acute phosphorus poisoning.
China med. J., 40, 1091-1100, (1926).
- 236.- KLEIN, H.P., LIPMANN, F.
The relationship of coenzyme A to lipid synthesis. II Experiments with rat liver.
J. biol. Chem., 203, 101-109, (1953).
- 237.- KNOOP, F.
Der Abbau aromatischer Fettsäuren im Tierkörper.
Beitr. chem. Physiol. Path., 6, 150-162, (1904).

246.- LANDS, W.E.M.

Metabolism of glycerolipids. II The enzymatic acylation of lysolecithin.

J. biol. Chem., 235, 2233-2237, (1960).

247.- LANGDON, R.G.

The requirements of triphosphopyridine nucleotide in fatty acid synthesis.

J. Amer. chem. Soc., 77, 5190-5192, (1955).

248.- LANGDON, R.G.

The biosynthesis of fatty acids in rat liver.

J. biol. Chem., 226, 615-629, (1957).

249.- LARRABEE, A.R., MAC DANIEL, E.G., BAKERMAN, H.A., VAGELOS, P.R.

Acyl carrier protein. V Identification of 4'-phosphopantetheine bound to a mammalian fatty acid synthetase preparation.

Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.), 54, 267-273, (1965).

250.- LASZT, L., VERZAR, F.

Beinflussung der Fettwanderung durch Jodessigsäure und Nebennierenextirpation.

Biochem. Z., 285, 356-367, (1936).

251.- LAUDAT, M.H., KOENIG, J., LAUDAT, P.

Incorporation "in vitro" du palmitate de sodium 1-¹⁴C dans les fractions lipidiques du foie de rat. (Tranches et hépatocytes isolés).

Bull. Soc. Chim. biol. (Paris), 51, 105-115, (1969).

252.- LAWRENCE, J.S., HUFFMAN, M.M.

An increase in the number of monocytes in the blood following subcutaneous administration of yellow phosphorus in oil.

Arch. Path., 7, 813-819, (1929).

253.- LESKY, E.

Die Phosphornekrose, klassisches Beispiel einer Berufskrankheit.

Wien. klin. Wschr., 78, 601-604, (1966).

254.- LIEBER, C.S.

Pathogenesis of hepatic steatosis.
Gastroenterology, 45, 760-764, (1963).

255.- LIPPEL, K., MEAD, J.F.

Alpha-oxidation of 2-hydroxystearic acid in vitro.
Biochim. biophys. Acta (Amst.), 152, 669-680, (1968).

256.- LOMBARDI, B.

Considerations on the pathogenesis of fatty liver.
Lab. Invest., 15, 1-20, (1966).

257.- LOMBARDI, B., OLER, A.

Choline deficiency fatty liver. Protein synthesis and release.
Lab. Invest., 17, 308-321, (1967).

258.- LOMBARDI, B., RECKNAGEL, R.O.

Interference with secretion of triglycerides by the liver as a common factor in toxic liver injury. With some observations on choline deficiency fatty liver.
Amer. J. Path., 40, 571-586, (1962).

259.- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J.

Protein measurement with the Folin phenol reagent.
J. biol. Chem., 193, 265-275, (1951).

260.- LU, A.Y.H., COON, M.J.

Role of hemoprotein P-450 in fatty acid ω -hydroxylation in a soluble enzyme system from liver microsomes.
J. biol. Chem., 243, 1331-1332, (1968).

261.- LUSK, G.

Metabolism in phosphorus poisoning.
Amer. J. Physiol., 19, 461-467, (1907).

262.- LUST, G., LYNEN, F.

The inhibition of the fatty acid synthetase multienzyme complex of yeast by long-chain acyl coenzyme A compounds.
Europ. J. Biochem., 7, 68-72, (1968).

263.- LYNEN, F.

Acetyl coenzyme A and the "fatty acid cycle".
Harvey Lect., 48, 210-244, (1952-1953).

264.- LYNEN, F.

Biosynthesis of saturated fatty acids.
Fed. Proc., 20, 941-951, (1961).

265.- LYNEN, F.

The role of biotin-dependent carboxylations in biosynthetic reactions.
The third Jubilee lecture.
Biochem. J., 102, 381-400, (1967).

266.- MARC CARTAN, W., FECITT, E.

First-aid treatment of phosphorus burns.
Brit. med. J., 2, 316-318, (1945).

267.- MAC DONALD, R.C., MEAD, J.F.

The alpha-oxidation system of brain microsomes. Cofactors for alpha-hydroxy acid decarboxylation.
Lipids, 3, 275-283, (1968).

268.- MAC INTOSH, R.

Acute phosphorus poisoning.
Amer. J. Dis. Child., 34, 595-602, (1927).

269.- MAC LEAN, S., MAC DONALD, A., SULLIVAN, R.C.

Acute phosphorus poisoning from the ingestion of roach paste. Report of fatal case in a child.
J. Amer. med. Ass., 93, 1789-1792, (1929).

270.- MAHU, G.

Le phosphorisme dans les manufactures d'allumettes. Hygiène. Prophylaxie.

H. Jouve Ed., Paris, (1898).

271.- MAJERUS, P.W., ALBERTS, A.W., VAGELOS, P.R.

The acyl carrier protein of fatty acid synthesis : purification, physical properties, and substrate binding site.

Proc. nat. Acad. Sci., (Wash.), 51, 1231-1238, (1964).

272.- MAJERUS, P.W., ALBERTS, A.W., VAGELOS, P.R.

Acyl carrier protein. III An enoyl hydratase specific for acyl carrier protein thioesters.

J. biol. Chem., 240, 618-621, (1965).

273.- MALLORY, F.B.

Phosphorus and alcoholic cirrhosis.

Amer. J. Path., 9, 557-567, (1933).

274.- MARGOLIS, S., VAUGHAN, M.

✕-glycerophosphate synthesis and breakdown in homogenates of adipose tissue.

J. biol. Chem., 237, 44-52, (1962).

275.- MARSHALL, E.K., ROWNTREE, L.G.

Studies in liver and kidney function in experimental phosphorus and chloroform poisoning.

J. exp. Med., 22, 333-346, (1915).

276.- MARTIN, W.B., DYKE, L.H., CODDINGTON, F.L., SNELL, A.M.

Carbon tetrachloride poisoning ; report of one case with necropsy and one nonfatal case with clinical laboratory studies.

Ann. intern. Med., 25, 488-497, (1946).

277.- MATTSON, F.H., BECK, L.W.

The specificity of pancreatic lipase for the primary hydroxyl groups of glycerides.

J. biol. Chem., 219, 735-740, (1956).

278.- MATTSON, F.H., VOLPENHEIM, R.A.

The digestion and absorption of triglycerides.

J. biol. Chem., 239, 2772-2777, (1964).

279.- MENU, M.

Intoxication par ingestion de phosphore blanc.

Bull. Méd. lég., 8, 301-302, (1965).

280.- MERCURI, O, PELUFFO, R.O., BRENNER, R.R.

Depression of microsomal desaturation of linoleic to γ -linolenic acid in the alloxan-diabetic rat.

Biochim. biophys. Acta (Amst.), 116, 409-411, (1966).

281.- MEYER, H.

Über die Wirkungen des Phosphors auf den tierischen Organismus.

Exper. Arch., 14, 313, (1881).

282.- MICHAELIS, L.

Das Wesen der chronischen Phosphorwirkung und der Phosphornekrose.

Arch. Gewerbepath. Gewerbehyg., 7, 477-489, (1936).

283.- MOLE, R., BALDI, F., BALLETTA, A.

Su di un caso di epatite cirrogena dopo intossicazione acuta da fosforo.

Riv. Anat. pat., 28, 646-672, (1965).

284.- MOON, H.D.

The pathology of fatal carbon tetrachloride poisoning with special reference to the histogenesis of the hepatic and renal lesions.

Amer. J. Path., 26, 1041-1057, (1950).

285.- NAKATSUKA, I.M.

Experimental studies on the fats and lipoids in the blood in hepatic disturbance.

Jap. J. Gastroent., 3, 153-159, (1936).

286.- NASH, T.

The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction.

Biochem. J., 55, 416-421, (1953).

287.- NEUBAUER, E.

Über das Schicksal der Milchsäure bei Normalen und Phosphorvergifteten Tieren.

Arch. exp. Path. Pharmac., 61, 387-400, (1909).

288.- NEUBERG, D., MAIBAUER, R.D.

Vergleichende Untersuchungen der oxydativen Leistungen von Mitochondrien und Microsomen bei experimenteller Leberschädigung.

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmac., 235, 291-300, (1959).

289.- NEWBURGER, R.A., BEASER, S.B., SHWACHMAN, H.

Phosphorus poisoning with recovery accompanied by electrocardiographic changes.

Amer. J. Med., 4, 927-930, (1948).

290.- NICOLETIS, M.A.

A propos de trois cas d'intoxication aigüe par le phosphore.

Thèse doct. Médecine, Paris, (1952).

291.- NIKKILA, E.A., KEKKI, M., OJALA, K.

Kinetic analysis of triglyceride metabolism in single rats.

Ann. Med. exp. Fenn., 44, 348-355, (1966).

292.- NORUM, K.R., BREMER, J.

The localization of acyl coenzyme A-carnitine acyltransferases in rat liver cells.

J. biol. Chem., 242, 407-411, (1967).

293.- NUGTEREN, D.H.

The enzymic chain elongation of fatty acids by rat liver microsomes.
Biochim. biophys. Acta (Amst.), 106, 280-290, (1965).

294.- NUMA, S., BORTZ, W.M., LYNEN, F.

Regulation of fatty acid synthesis at the acetyl-CoA carboxylation step.
Adv. Enz. Regul., 3, 407-423, (1965).

295.- OBERMER, E.

Phosphorus burns.
Lancet, 244, 202, (1943).

296.- OPIE, E.L., ALFORD, L.B.

Influences of diet on the toxicity of substances which produce lesions
of the liver or the kidney.
J. Amer. med. Ass., 63, 136-137, (1914).

297.- OPIE, E.L., ALFORD, L.B.

The influences of diet upon necrosis caused by hepatic and renal poisons.
J. exp. Med., 21, 1-20, (1915).

298.- OSHINO, N., IMAI, Y., SATO, R.

Electron transfer mechanism associated with fatty acid desaturation
catalysed by liver microsomes.
Biochim. biophys. Acta (Amst.), 128, 13-28, (1966).

299.- PALAY, S.L., KARLIN, L.J.

An electron microscopic study of the intestinal villus. II The pathway
of fat absorption.
J. biophys. biochem. Cytol., 5, 373-384, (1959).

300.- PALIARD, P., MOTIN, J., EVREUX, J.

Les hépatites toxiques graves.
Sem. Hôp. Paris, 45, 2077-2084, (1969).

301.- PANDE, S.V., MEAD, J.F.

Distribution of long-chain fatty acid-activating enzymes in rat tissues.
Biochim. biophys. Acta (Amst.), 152, 636-638, (1968).

302.- PATEL, M.S., HANSON, R.W.

Carboxylation of pyruvate by isolated rat adipose tissue mitochondria.
J. biol. Chem., 245, 1302-1310, (1970).

303.- PERSONNE, J.

Emploi de l'essence de térébenthine pour combattre l'empoisonnement par
le phosphore.
Bull. Acad. Méd. (Paris), 34, 126, (1869).

304.- PETERS Jr., T.

Proposals for standardization of total protein assays.
Clin. Chem., 14, 1147-1159, (1968).

305.- PFAUNDLER, M.

Ueber ein Verfahren zur Bestimmung des Amidosäurenstickstoffs im Harn.
Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem., 30, 75-89, (1900).

306.- PIERSON, G.M., KLEMMER, R.N.

A case of acute phosphorus poisoning.
Proc. path. Soc. Philad., 27, 48, (1925).

307.- PIETRAS, R.J., STAVRAKOS, C., GUNNAR, R.M., TOBIN, J.R.

Phosphorus poisoning simulating acute myocardial infarction.
Arch. intern. Med., 122, 430-434, (1968).

308.- PIRIBAUER, J., WALLENKO, H.

Tödliche Phosphorvergiftung.
Med. Klin., 56, 1043-1046, (1961).

309.- PORTER, J.W., WAKIL, S.J., TIETZ, A., JACOB, M.I., GIBSON, D.M.

Studies on the mechanism of fatty acid synthesis. II Cofactors require-
ments of the soluble pigeon liver system.
Biochim. biophys. Acta (Amst.), 25, 35-41, (1957).

310.- PRADER, A.

Cytochrom-c-Gehalt der toxisch bedingten Fettleber.
Experientia (Basel), 3, 459-460, (1947).

311.- PUGH, E.L., WAKIL, S.

Studies on the mechanism of fatty acid synthesis. XIV The prosthetic group of acyl carrier protein and the mode of its attachment to the protein.
J. biol. Chem., 240, 4727-4733, (1965).

312.- QUAGLIARIELLO, E., LANDRISCINA, C., CORATELLI, P.

Fatty acid synthesis by chain elongation in rat liver-mitochondria.
Biochim. biophys. Acta (Amst.), 164, 12-24, (1968).

313.- RAULIN, J., LAPOUS, D., DAUVILLIER, P., RERAT, A.

Incorporation préférentielle des acides gras élaïdisés en position γ des phospholipides hépatiques du porc.
C.R. Acad. Sci. (Paris), 260, 344-347, (1965).

314.- READ, B.

Phosphorus poisoning.
Nat. med. J. China, 12, 46, (1926).

315.- READ, R.C., WHITE, H.J.

Corrosive stricture of the stomach in a phosphorus worker.
J. Ark. med. Soc., 66, 96-99, (1969).

316.- REISER, R., FU, H.C.

Acyl group exchange in the intestinal lumen during fat digestion.
Biochim. biophys. Acta (Amst.), 116, 563-569, (1966).

317.- RESHEF, L., HANSON, R.W., BALLARD, F.J.

Glyceride-glycerol synthesis from pyruvate. Adaptative changes in phosphoenolpyruvate carboxykinase and pyruvate carboxylase in adipose tissue and liver.
J. biol. Chem., 244, 1994-2001, (1969).

318.- RESHEF, L., SHAPIRO, B.

Depletion and regeneration of fatty acid-absorbing capacity of adipose tissue and liver particles.

Biochim. biophys. Acta (Amst.), 125, 456-464, (1966).

319.- RETTIG, H.

Zur Frage des toxogenen Eisweisszerfalls bei der Phosphorvergiftung.

Arch. exp. Path. Pharmac., 76, 345-366, (1914).

320.- REVEIL, O.

Sur l'empoisonnement par le phosphore.

Ann. Hyg. publ., 12, 370-384, (1859).

321.- RISACK, M.A.

An epinephrine-sensitive lipolytic activity in adipose tissue.

J. biol. Chem., 236, 657-662, (1961).

322.- RISACK, M.A.

Activation of an epinephrine-sensitive lipolytic activity from adipose tissue by adenosine-3'5'-phosphate.

J. biol. Chem., 239, 392-395, (1964).

323.- RITTENBERG, D., BLOCH, K.

The utilization of acetic acid for fatty acid synthesis.

J. biol. Chem., 154, 311-312, (1944).

324.- ROBINSON, N., PHILLIPS, B.M.

Quantitative thin-layer chromatography of serum phospholipids.

Clin. chim. Acta, 8, 385-392, (1963).

325.- RODBELL, M., FREDRICKSON, D.S., ONO, K.

Metabolism of chylomicron proteins in the dog.

J. biol. Chem., 234, 567-571, (1959).

326.- RODGERS, J.B., BOCHENEK, W.

Localization of lipid reesterifying enzymes of the rats small intestine. Effect of jejunal removal on ileal enzyme activities.
Biochim. biophys. Acta (Amst.), 202, 426-435, (1970).

327.- ROHEIM, P.S., GIDEZ, L.I., EDER, H.A.

Extrahepatic synthesis of lipoproteins of plasma and chyle : role of the intestine.
J. clin. Invest., 45, 297-300, (1966).

328.- RONDOT, E.

L'essence de térébenthine dans le traitement de l'empoisonnement aigu par le phosphore.
A. Bellier & Cie éd., Bordeaux, (1886).

329.- ROSENBAUM, F.

Kohlehydratbestand nach akuten Intoxicationen.
Arch. exp. Path. Pharmac., 15, 450-453, (1882).

330.- ROSSIER, P.H.

Contribution à l'étude de l'intoxication aiguë par le phosphore.
Schweiz. med. Wschr., 8, 890-891, (1927).

331.- ROUILLER, C.

The liver.
Academic Press, New York London (1963-1964).

332.- ROUX, J.

Contribution à l'étude des foies gras obtenus par intoxication.
Biol. méd. (Paris), 49, 502-568, (1960).

333.- RUBITSKY, H.J., MYERSON, R.M.

Acute phosphorus poisoning.
Arch. intern. Med., 83, 164-178, (1949).

334.- SAIFER, A., GOLDMAN, L.

The free fatty acids bound to human serum albumin.

J. Lipid Res., 2, 268-270, (1961).

335.- SALFELDER, K., SEELKOPF, C.

Über akute Phosphorvergiftungen beim Menschen mit Sektionsbefunden.

Frankfurt, Z. Path., 72, 357-378, (1963).

336.- SALFELDER, K., SEELKOPF, C., INGLESSIS, V.

Leberbefunde bei der akuten Phosphorvergiftung des Menschen.

Zbl. allg. Path. path. Anat., 108, 524-529, (1966).

337.- SARZALA, M.G., VAN GOLDE, L.M.G., DE KRUYFF, B., VAN DEENEN, L.L.M.

The intramitochondrial distribution of some enzymes involved in the biosynthesis of rat-liver phospholipids.

Biochim. biophys. Acta (Amst.), 202, 106-119, (1970).

338.- SAUNDERS, D.R., DAWSON, A.W.

Studies on the metabolism of glycerol by the small intestine in vitro and in vivo.

Biochem. J., 82, 477-483, (1962).

339.- SAVARY, P., DESNUELLE, P.

Sur quelques éléments de spécificité pendant l'hydrolyse enzymatique des triglycérides.

Biochim. biophys. Acta (Amst.), 21, 349-360, (1956).

340.- SAXL, P.

Über Fett- und Esterspaltung in den Geweben.

Biochem. Z., 12, 343-360, (1908).

341.- SCANU, A., CUMP, E., TOTH, J., KOGA, S., STILLER, E., ALBERS, L.

Degradation and reassembly of a human serum high density lipoprotein. Evidence for differences in lipid affinity among three classes of polypeptides chains.

Biochemistry, 9, 1327-1335, (1970).

- 342.- SCANU, A., TOTH, J., EDELSTEIN, C., KOGA, S., STILLER, E.
Fractionation of human serum high density lipoprotein in urea solutions.
Evidence for polypeptide heterogeneity.
Biochemistry, 8, 3309-3316, (1969).
- 343.- SCHERPHOF, G.L., VAN DEENEN, L.L.M.
Phospholipase A activity of rat-liver mitochondria.
Biochim. biophys. Acta (Amst.), 98, 204-206, (1965).
- 344.- SCHILLER, C.M., DAVID, J.S.K., JOHNSTON, J.M.
The subcellular distribution of triglyceride synthesis in the intestinal mucosa.
Biochim. biophys. Acta (Amst.), 210, 489-492, (1970).
- 345.- SCHMIT, J.M.
Contribution à l'étude analytique des lipides par la réaction sulfo-phosphovanillique. Applications pharmacologiques et biologiques.
Thèse doct. Pharmacie, Lyon, (1964).
- 346.- SCHOTZ, M.C., ARNESJO, B., OLIVECRONA, T.
The role of the liver in the uptake of plasma and chyle triglycerides in the rat.
Biochim. biophys. Acta (Amst.), 125, 485-495, (1966).
- 347.- SCHUCHARDT.
Recherches sur l'empoisonnement aigu par le phosphore.
J. Chim. méd., 3, 84-88, (1857).
- 348.- SCHUMAKER, V.N., ADAMS, G.H.
Circulating lipoproteins.
Ann. Rev. Biochem., 38, 113-136, (1969).
- 349.- SCHWARTZ, D.
Méthodes statistiques à l'usage des médecins et des biologistes,
Flammarion & Cie, éd, Paris (1963).

350.- SCORPIO, R.M., MASORO, E.J.

Differences between manganese and magnesium ions with regard to fatty acid biosynthesis, acetyl-coenzyme A carboxylase activity and malonyl-coenzyme A decarboxylation.

Biochem. J., 118, 391-399, (1970).

351.- SCOW, R.O., STEIN, Y., STEIN, O.

Incorporation of dietary lecithin and lysolecithin into lymph chylomicrons in the rat.

J. biol. Chem., 242, 4919-4924, (1967).

352.- SEAKINS, A., ROBINSON, D.S.

Changes associated with the production of fatty livers by white phosphorus and by ethanol in the rats.

Biochem. J., 92, 308-312, (1964).

353.- SEDLACEK, J.

Popálení oka fosforem.

Čs. Oftal., 25, 36-38, (1969).

354.- SENIOR, J.R., ISSELBACHER, K.J.

Activation of long-chain fatty acids by rat-gut mucosa.

Biochim. biophys. Acta (Amst.), 44, 399-400, (1960).

355.- SEUBERT, W., GREULL, G., LYNEN, F.

Die Synthese der Fettsäuren mit gereinigten Enzymen des Fettsäurezyklus.

Angew. Chem., 69, 359-361, (1957).

356.- SHAFRIR, E., GORIN, E.

Release of glycerol in conditions of fat mobilization and deposition.

Metabolism, 12, 580-587, (1963).

357.- SHORE, B., SHORE, V.

Isolation and characterization of polypeptides of human serum lipoproteins.

Biochemistry, 8, 4510-4516, (1969).

- 358.- SHRAGO, E., SPENNETTA, T., GORDON, E.
Fatty acid synthesis in human adipose tissue.
J. biol. Chem., 244, 2761-2766, (1969).
- 359.- SICOT, C.
Les hépatites phalloïdiennes et phosphorées.
Rev. Méd. (Paris), 19, 1243-1246, (1968).
- 360.- SICOT, C., BISMUTH, C., FREJAVILLE, J.P., BERTHELOT, P., RUEFF, B.
BENHAMOU, J.P.
Les hépatites toxiques.
Rev. Franç. Etud. clin. biol., 14, 192-212, (1969).
- 361.- SIMONDS, J.P.
The effect of feeding sugar upon the esterase content of the blood serum and organs in phosphorus poisoning.
J. exp. Med., 28, 663-672, (1918).
- 362.- SKEGGS Jr., L.T., HOCHSTRASSER, H.
Rapid automatic electrophoretic analysis. I Methods and apparatus.
Ann. N.Y. Acad. Sci., 102, 144-160, (1962).
- 363.- SMITH, S.W., WEISS, S.B., KENNEDY, E.P.
The enzymatic dephosphorylation of phosphatidic acids.
J. biol. Chem., 228, 915-922, (1957).
- 364.- SONTAG, L.W.
Phosphorus poisoning in an infant resulting from an antirachiting preparation.
Amer. J. Dis. child., 56, 114-118, (1938).
- 365.- SPENCER, A.F., LOWENSTEIN, J.M.
The supply of precursors for the synthesis of fatty acids.
J. biol. Chem., 237, 3640-3648, (1960).

366.- SRERE, P.A.

The citrate cleavage enzyme. I. Distribution and purification.

J. biol. Chem., 234, 2544-2547, (1959).

367.- STACY, W.C.

Dangers of phosphorus in fireworks.

J. Amer. med. Ass., 77, 1514, (1921).

368.- STEIN, Y., SHAPIRO, B.

Assimilation and dissimilation of fatty acids by the rat liver.

Amer. J. Physiol., 196, 1238-1241, (1959).

369.- STOKKE, O., TRY, K., ELDJARN, L.

α-oxidation as an alternative pathway for the degradation of branched-chain in fatty acids in man, and its failure in patients with Refsum's disease.

Biochim. biophys. Acta. (Amst.), 144, 271-284, (1967).

370.- STRAUSS, E.W.

Electron microscopic study of intestinal fat absorption in vitro from mixed micelles containing linolenic acid, monoolein,

J. Lipid Res., 7, 307-323, (1966).

371.- SUMMERLIN, W.T., WALDER, A.I., MONCRIEF, J.A.

White phosphorus burns and massive hemolysis.

J. Trauma., 7, 476-484, (1967).

372.- SUMPER, M., OESTERHELT, D., RIEPERTINGER, C., LYNEN, F.

Die Synthese verschiedener Carbonsäuren durch den Multienzymkomplex der Fettsäuresynthese aus Hefe und die Erklärung ihrer Bildung.

Europ. J. Biochem., 10, 377-387, (1969).

373.- SUTHERLAND, E.W., RALL, T.W., MENON, T.

Adenyl cyclase. I. Distribution, preparation and properties.

J. biol. Chem., 237, 1220-1227, (1962).

374.- SWINTON, C.F.

Acute phosphorus poisoning.

Brit. med. J., 2, 1080, (1927).

375.- TABBARA, W., PROTEAU, J., DUMONT, G., DEROBERT, L.

L'intoxication par l'amanite phalloïde. Trois nouveaux cas.

Ann. Méd. lég., 42, 181-196, (1962).

376.- Tests enzymatiques et méthodes de chimie-clinique.

Boehringer Mannheim France (1967).

377.- THERON, M.

Du phosphore au point de vue chimique et toxicologique.

Etude Pharm., 1ère Classe, Firmin et Cabirou Ed., Montpellier (1877).

378.- THOMAS, F.

Etude médico-légale d'un cas d'empoisonnement criminel à l'aide d'un raticide phosphoré.

Ann. Méd. lég., 25, 155-167, (1945).

379.- TRELAT, U.

De la nécrose causée par le phosphore.

Thèse Agrégation Chirurgie, Paris (1857).

380.- TRUHAUT, R., CLAUDE, J.R., WARNET, J.M.

Etude des modifications biochimiques provoquées par des intoxications aiguës et subaiguës du phosphore blanc chez le rat. I. Action de doses répétées administrées par voie parentérale.

Ann. pharm. franç., 27, 17-23, (1969).

381.- TUBBS, P.K., GARLAND, P.B.

Membranes and fatty acid metabolism.

Brit. med. Bull., 24, 158-164, (1968).

382.- VAGELOS, P.R.

Lipid metabolism.

Ann. Rev. Biochem., 33, 139-172, (1964).

383.- VAGELOS, P.R., ALBERTS, A.W., MARTIN, D.B.

Studies on the mechanism of activation of acetyl coenzyme A carboxylate by citrate.

J. biol. Chem., 238, 533-540, (1963).

384.- VAGELOS, P.R., MAJERUS, P.W., ALBERTS, A.W., LARRABEE, A.R., AILHAUD, G.P.

Structure and function of the acyl carrier protein.

Fed. Proc., 25, 1485-1494, (1966).

385.- VAN DEN BOSCH, H., BONTE, H.A., VAN DEENEN, L.L.M.

On the anabolism of lysolecithin.

Biochim. biophys. Acta (Amst.), 98, 648-651, (1965).

386.- VAN SLYKE, D.D.

The present significance of the aminoacids in physiology and pathology.

Arch. intern. Med., 19, 56-78, (1917).

387.- VAN TOL, A., HULSMANN, W.C.

The localization of palmitoyl-coenzyme A : carnitine palmitoyl transferase in rat liver.

Biochim. biophys. Acta (Amst.), 189, 342-353, (1969).

388.- VAUGHAN, M.

The metabolism of adipose tissue in vitro.

J. Lipid Res., 2, 293-316, (1962).

389.- VETTER, A.

Ueber die akute Phosphorvergiftung und deren Behandlung.

Arch. path. Anat., 53, 168-209, (1871).

390.- VOGEL, W.C., BIERMAN, E.L.

Post-heparin serum lecithinase in man and its positional specificity.

J. Lipid Res., 8, 46-53, (1967).

391.- VOGT, V.

A case of phosphorus poisoning.

China med. J., 38, 123, (1924).

392.- WAITE, M., VAN DEENEN, L.L.M.

Hydrolysis of phospholipids and glycerides by rat-liver preparations.

Biochim. biophys. Acta (Amst.), 137, 498-517, (1967).

393.- WAITE, M., WAKIL, S.J.

Studies on the mechanism of action of acetyl coenzyme A carboxylase.

III. Enzyme-bound 1'-N-carboxybiotin as the carboxylation intermediate.

J. biol. Chem., 241, 1909-1914, (1966).

394.- WAKIL, S.J.

A malonic acid derivative as an intermediate in fatty acid synthesis.

J. Amer. chem. Soc., 80, 6465, (1958).

395.- WAKIL, S.J., PORTER, J.W., GIBSON, D.M.

Studies on the mechanism of fatty acid synthesis. I. Preparation and purification of an enzyme system for reconstruction of fatty acid synthesis.

Biochim. biophys. Acta (Amst.), 24, 453-461, (1957).

396.- WAKIL, S.J., PUGH, E.L., SAUER, F.

The mechanism of fatty acid synthesis.

Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.), 52, 106-114, (1964).

397.- WALKER, P.R., BAILEY, E.

Role of "malic enzyme" in lipogenesis.

Biochim. biophys. Acta (Amst.), 187, 591-593, (1969).

398.- WECHSLER, L., WECHSLER, R.L.

Phosphorus poisoning : the latent period and unusual gastrointestinal lesions.

Gastroenterology, 17, 279-283, (1951).

399.- WEISS, S.B., KENNEDY, E.P.

The enzymatic synthesis of triglycerides.

J. Amer. chem. Soc., 78, 3550, (1956).

400.- WELLS, W.W., SCHULTZ, J., LYNEN, F.

Incorporation of C¹⁴- pantothenate into the fatty acid synthetase complex of growing baker's yeast.

Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.), 56, 633-639, (1966).

401.- WENTKER, B.P., NEUHEISER, B.L.

Acute phosphorus poisoning : case with recovery.

J. Miss. med. Ass., 28, 220, (1931).

402.- WERTHAM, F.

Central nervous system in acute phosphorus poisoning.

Arch. Neurol. Psychiat. (Chic.), 28, 320-330, (1932).

403.- WHEREAT, A.F., ORISHIMO, M.W., NELSON, J., PHILLIPS, S.J.

The location of different synthetic systems for fatty acids in inner and outer mitochondrial membranes from rabbit heart.

J. biol. Chem., 244, 6498-6506, (1969).

404.- WHIPPLE, G.H., PEIGHTAL, T.C., CLARK, A.H.

Tests for hepatic function and disease under experimental conditions.

Phenoltetrachlorphtalein.

Bull. Johns Hopk. Hosp., 24, 343-357, (1913).

405.- WILGRAM, G.F., KENNEDY, E.P.

Intracellular distribution of some enzymes catalysing reactions in the biosynthesis of complex lipids.

J. biol. Chem., 238, 2615-2619, (1963).

406.- WILLCOX, W.

Toxic jaundice.

Lancet, 2, 1-6, (1931).

407.- WILLECKE, K., RITTER, E., LYNEN, F.

Isolation of an acyl carrier protein component from the multienzyme complex of yeast fatty acid synthetase.

Europ. J. Biochem., 8, 503-509, (1969).

408.- WILLIAMSON, C.S., MANN, F.C.

Studies on the physiology of the liver. V. The hepatic factor in chloroform and phosphorus poisoning.

Amer. J. Physiol., 65, 267-276, (1923).

409.- WILLIAMSON, I.P., GOLDMAN, J.K., WAKIL, S.J.

Studies on the fatty acid synthetizing system from pigeon liver.

Fed. Proc., 25, 340, (1966).

410.- WIT-PEETERS, E.M.

Synthesis of long-chain fatty acids in mitochondria.

Biochim. biophys. Acta. (Amst.), 176, 453-462, (1969).

411.- WOHLGEMUTH, J.

Zur Kenntnis des Phosphorharns.

Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem., 44, 74-84, (1905).

412.- ZILVERSMIT, D.B.

Formation and transport of chylomicrons.

Fed. Proc., 26, 1599-1605, (1967).

